

MTA Doktori Értekezés

**FESZÜLTÉG-FÜGGŐ IONCSATORNÁK KAPUZÁSA ÉS  
KÖLCSÖNHATÁSA SKORPIÓ TOXINOKKAL**

**VARGA ZOLTÁN**



**DEBRECENI EGYETEM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiológiai Intézet**

Debrecen

2017

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK .....	5
2. BEVEZETÉS .....	6
2.1 A feszültség-függő $K^+$ csatornák kapuzása és kölcsönhatása skorpió toxinokkal.....	7
2.1.1 A kálium ioncsatornák áttekintése.....	7
2.1.2 A feszültség-függő $K^+$ csatornák szerkezeti sajátosságai és kapuzása .....	12
2.1.3 A $K_v$ csatornák kapuzásának pH függése.....	19
2.1.4 A $K_v1.3$ szerepe T sejtekben.....	22
2.1.5 A $K_v$ csatornákat gátló peptid skorpió toxinok.....	25
2.1.6 Motiváció a $K_v$ csatornák kapuzási mechanizmusának és a csatorna-toxin kölcsönhatás részleteinek megismeréséhez .....	28
2.2 A feszültség-függő $Na^+$ ioncsatornák kapuzása.....	29
2.2.1 A nátrium ioncsatornák áttekintése .....	29
2.2.2 A feszültség-függő $Na^+$ csatornák szerkezeti sajátosságai és kapuzása.....	32
2.2.3 $Nav1.5$ , a szív feszültség-függő $Na^+$ csatornája .....	34
2.2.4 Motiváció a $hNav1.5$ csatorna kapuzásának molekuláris szintű megértéséhez .....	35
2.3 A Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) technika meghonosítása .....	35
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	37
3.1 A $K_v$ csatornák kapuzásának és az azt moduláló faktoroknak a vizsgálata.....	37
3.1.1 A VSD és a pórus domén közötti csatolás és kationok hatása a csatolásra .....	37
3.1.2 Az intra- és extracelluláris pH hatása a $K_v$ csatorna kapuzásra.....	37
3.1.3 A $K_v1.3$ inaktivációjának anomális pH-függése.....	37
3.2 $K_v$ csatornákat gátló skorpió toxinok vizsgálata .....	38
3.2.1 Új $K_v1.3$ -gátló skorpió toxinok azonosítása és karakterizálása.....	38
3.2.2 Az anuroctoxin $K_v1.3$ iránti szelektivitásának javítása.....	38
3.3 A szívizom $Nav1.5$ csatorna kapuzásának vizsgálata .....	38
3.3.1 Az egyes VSD-k aktivitásának vizsgálata a kapuzás során. ....	38
3.3.2 Az $Nav1.5$ inaktivációját leíró modell tökéletesítése .....	38

3.4	A Feszültség-zár Fluorometria (VCF) technika meghonosítása és alkalmazása .....	39
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	40
4.1	Sejtek és ioncsatorna expressziós vektorok .....	40
4.1.1	Humán limfociták .....	40
4.1.2	Sejtvonalak .....	40
4.1.3	Tranziens transzfekció .....	42
4.1.4	<i>Xenopus laevis</i> oociták előkészítése és injektálása .....	42
4.2	Molekuláris biológia .....	43
4.2.1	A Kv1.3 csatorna mutációi .....	43
4.2.2	Az Nav1.5 csatorna mutációi és mRNS szintézis .....	43
4.3	Toxinok .....	43
4.3.1	Natív és rekombináns toxinok .....	43
4.3.2	Anurotoxin előállítása kémiai szintézissel .....	44
4.4	In vivo DTH reakciók .....	44
4.5	Az alkalmazott elektrofiziológiai technikák általános áttekintése .....	45
4.5.1	A két-elektrodás feszültség-zár technika (TEVC) .....	46
4.5.2	A Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika (COVG) .....	47
4.5.3	A kapuzási áram és kapuzási töltés mérése .....	48
4.5.4	Feszültség-zár fluorometria (Voltage-clamp Fluorometry = VCF) .....	49
4.5.5	A patch-clamp technika .....	52
4.6	Az elektrofiziológiai mérésekhez használt műszerek és oldatok .....	53
4.6.1	Feszültség-zár fluorometriás mérések (Voltage-clamp Fluorometry = VCF) TEVC technikával .....	53
4.6.2	Feszültség-zár fluorometriás mérések COVG technikával .....	53
4.6.3	Patch-clamp mérések .....	54
4.7	Oldatok .....	54
4.8	Az elektrofiziológiai és VCF mérések kiértékelése .....	56
5.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS .....	58
5.1	A Kv csatornák kapuzásának vizsgálata .....	58

5.1.1	A feszültség-szenzor domén és az aktivációs kapu kölcsönhatásának vizsgálata különböző kationok segítségével. ....	58
5.1.2	Az intra- és extracelluláris pH csökkentésének hatása a $K_v$ csatornák kapuzására ..	63
5.1.3	A $K_v1.3$ csatorna inaktivációjának extracelluláris pH-függése .....	69
5.2	$K_v$ csatornákat gátló skorpió toxinok vizsgálata .....	75
5.2.1	Új $K_v1.3$ csatornát gátló peptid toxinok felkutatása és karakterizálása .....	75
5.2.1.1	A Csx20 skorpiótoxin szelektivitást meghatározó tulajdonságainak vizsgálata	78
5.2.1.2	A margatoxin szelektivitásának vizsgálata .....	84
5.2.1.3	Egy kivételes tulajdonságokkal rendelkező skorpiótoxin, a Vm24 .....	85
5.2.2	Az anurotoxin szelektivitásának javítása célzott pontmutációkkal .....	90
5.3	A szív feszültség-függő $Na_v1.5$ csatorna kapuzásának vizsgálata .....	94
5.3.1	A feszültség-szenzor domének mozgásának vizsgálata.....	94
5.3.1.1	A vad-típusú $hNa_v1.5$ kapuzása .....	94
5.3.1.2	Brugada-szindróma mutáns csatornák kapuzása .....	100
5.3.2	A DIII- és DIV-VSD szerepe az inaktivációban, az inaktivációs mechanizmus modellje .....	102
5.4	A Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) technika meghonosítása .....	110
5.4.1	A membrán koleszterin tartalmának hatása $K_v$ csatornák kapuzására .....	111
6.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	114
7.	GYAKORLATI JELENTŐSÉG .....	116
8.	IRODALOMJEGYZÉK .....	117
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	133
10.	KÖZLEMÉNYEK .....	134
10.1	A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények:.....	134
10.2	A disszertáció alapjául szolgáló közlemények: .....	135
10.3	A PhD értekezést követő egyéb közlemények:.....	139
10.4	Könyvfejezetek .....	142
10.5	Tudományometriai összesítés:.....	143

## 1. RÖVIDÍTÉSEK

COVG	Cut Open Vaseline Gap = Felnyitott, vazelinnel szigetelt oocita technika
DTH	Delayed Type Hypersensitivity reaction = késői hiperszenzitivitási reakció
Kir	Befelé egyenirányító K <sup>+</sup> csatorna
K <sub>v</sub>	Feszültség-függő K <sup>+</sup> csatorna
Na <sub>v</sub>	Feszültség-függő Na <sup>+</sup> csatorna
PD	Pórus Domén
RCF	Remaining Current Fraction = megmaradó áramhányad (= MÁH)
RMSD	Root-Mean-Square Deviation = átlagos négyzetes gyökeltérés
TEVC	Two-Electrode Voltage Clamp = Két-elektrodás feszültség-zár technika
VCF	Voltage Clamp Fluorometry = Feszültség-zár fluorometria
VSD	Voltage Sensor Domain = Feszültség-érzékelő domén
WT	Wild Type = vad-típus

## 2. BEVEZETÉS

A feszültség-függő ioncsatornák transzmembrán fehérjék, melyek ionok szelektív és szabályozott átjuttatását valósítják meg a sejtmembránon keresztül. A membrán két oldala között mérhető feszültség, azaz a membránpotenciál, értéke határozza meg a csatornák nyitásához vezető konformáció-változás bekövetkezésének valószínűségét (1). A csatorna nyitását követően ionok áramlanak a membrán másik oldalára, ami viszont módosítja a membránpotenciált, így lehetőséget teremt visszacsatolós szabályozás megvalósítására. Amennyiben a membránpotenciál új értéke elősegíti az adott csatorna nyitását, akkor pozitív visszacsatolás révén az összes csatorna gyors nyitása következik be, az adott ionra vonatkozó permeabilitás drámaian megnő és a membránpotenciál rövid időn belül az adott ion egyensúlyi potenciálját közelíti meg. Ez történik például ingerelhető sejtekben az akciós potenciál kezdeti, depolarizációs szakaszában a feszültség-függő  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_V$ ) csatornák nyitása során. Amikor viszont a membránpotenciál új értéke csökkenti a csatorna nyitási valószínűségét, negatív visszacsatolás valósul meg, ugyanis a nyitás hatására átáramló ionok a csatorna zárásához vezetnek, ami a membránpotenciál stabilizálását eredményezi, mint például a feszültség-függő  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_V$ ) csatornák esetén.

A feszültség-függő ioncsatornák tehát igen hatékonyan és pontosan képesek szabályozni a sejtek membránpotenciálját, és ennek révén számos sejtfunkcióban vesznek részt, mint például a proliferáció, differenciáció, apoptózis, ozmo-reguláció, a sejtciklus, a hormon szekréció és a sejtek ingerelhetőségének szabályozása (2-7), továbbá az akciós potenciál sejtre jellemző tulajdonságainak meghatározása. Bár a csatornák legismertebb funkciója az idegi vezetés és az izom összehúzódás megvalósítása, nyilvánvaló, hogy a nem-ingerelhető sejtek homeosztázisához is nélkülözhetetlenek a fehérjék.

A membránpotenciál által kapuzott, közeli rokonságot mutató  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák mellett ismertek feszültség-függő  $\text{Cl}^-$  és  $\text{H}^+$  csatornák is, ezek azonban szerkezetileg jelentősen eltérnek az előbbi háromtól (8). Továbbá az említett, depolarizációra aktiválódó csatornák mellett léteznek HCN, azaz hiperpolarizációra aktiválódó, ciklikus-nukleotid kapuzott csatornák is. E számos csatorna típus közül munkám során  $\text{K}_V$  és  $\text{Na}_V$  csatornákat tanulmányoztam, így az alábbiakban ezeket taglalom részletesebben.

A  $K_v$ ,  $Na_v$  és  $Ca_v$  csatornák nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak. A  $K_v$  csatornák négy, egyenként hat transzmembránból álló hélixet tartalmazó alegység (~ 600 aminosav) nem-kovalens összekapcsolódásából állnak össze, míg az  $Na_v$  és  $Ca_v$  csatornák egyetlen folytonos polipeptid láncból állnak (~2000 aminosav), melyek négy, a  $K_v$  csatornák egy-egy alegységének megfelelő, szintén hat transzmembrán hélixből álló, domént tartalmaznak. A tanulmányozott  $K_v$  és  $Na_v$  csatornák szerkezetét és működését részletesen ismertetem a megfelelő fejezetekben.

## 2.1 A feszültség-függő $K^+$ csatornák kapuzása és kölcsönhatása skorpió toxinokkal

### 2.1.1 A kálium ioncsatornák áttekintése

Az ioncsatornák legnagyobb és legváltozatosabb csoportját alkotják a kálium ioncsatornák. Fő szerepük legtöbb sejtben a nyugalmi membránpotenciál beállítása és stabilizálása, valamint ingerelhető sejtekben az akciós potenciál repolarizációs fázisának kialakítása. Jelenleg mintegy 100 különböző  $K^+$  csatorna gén ismert emlősökben (8). A káliumcsatornák szerkezet és funkció alapján a következő családokra oszthatók:  $K_{ir}$  (inward rectifier = befelé egyenirányító), két pórus-formáló hurkot tartalmazó,  $Ca^{2+}$ -aktivált és feszültség-függő káliumcsatornák. A kutatásaim fő tárgyát képező feszültség-függő  $K^+$  csatornákat mutatom be részletesebben a későbbiekben a többi család vázlatos ismertetése mellett.

#### Kir csatornák

A  $K_{ir}$  (inward rectifier) csatornákat azért hívják “befelé egyenirányító” csatornáknak, mert a sejt belsejébe lényegesen nagyobb áramokat képesek vezetni, mint a sejtől kifelé. Ennek a mechanizmusnak az az oka, hogy kifelé folyó  $K^+$  áramlás esetén a sejtben található poliaminok (pl. spermin), illetve  $Mg^{2+}$  ionok belülről blokkolják a csatornát, így gátolva a kifelé irányuló áramot (9).

Jelenleg 15  $K_{ir}$  csatorna gén ismert, melyeket működésük alapján négy csoportra osztottak: klasszikus  $K_{ir}$ , G-fehérje kapuzott, APT-szenzitív és  $K^+$  transzport csatornák (10).

A  $K_{ir2.x}$  alcsalád tagjai, melyeket a „klasszikus”  $K_{ir}$  csatornáknak tekintünk, jellemzően a kamrai szívizom sejteken fejeződnek ki  $K_{ir2.1}/K_{ir2.2}$  heteromer formában, ahol a nyugalmi

membránpotenciál fenntartása a funkciójuk (11). E csatornák megtalálhatók még endotélsejteken (12), valamint központi idegrendszeri neuronokon, ahol szintén a nyugalmi membránpotenciált szabályozzák (13). Kifejeződnek továbbá Schwann sejtekben (14), és vese kortikális sejtekben is (15).

A Kir3.x alcsalád tagjainak működését a membránhoz kötött trimer G-fehérjék  $\beta\gamma$ -alegységei szabályozzák (G protein-activated inward rectifier  $K^+$  channel = GIRK), melyek jellemző agonistái az acetilkolin, adenzin, GABA és dopamin (16). A GIRK1/GIRK4 heteromer csatornák egyik jól ismert funkciója a pulzus csökkentése acetilkolin hatására (17), de leírták ezen alcsalád jelenlétét neuronokban is, ahol a sejtek ingerelhetőségét szabályozzák (18).

A Kir6.x csatornák közismert szerepe az inzulin szekréció szabályozása a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben. A Kir6.2 csatornák spontán nyitását az intracelluláris ATP szint emelkedése gátolja a szulfonilurea receptorokon (SUR) keresztül (19, 20). A csatornák kifejeződnek a szívizomban is, ahol az ischemia hatásának kivédésében játszanak szerepet (21).

Szövetek széles spektrumában expresszálódnak az úgynevezett  $K^+$  transzport csatornák (Kir1.1, Kir4.x, Kir5.x és Kir7.1) (15, 22, 23), melyek fő funkciója a  $K^+$  koncentráció szabályozása.

Két pórus-formáló hurkot tartalmazó káliumcsatornák ( $K_{2P}$ )

A két pórus-formáló hurkot tartalmazó káliumcsatornák közül jelenleg 15 humán gén ismert. Szerkezetükre jellemző, hogy egy alegységük négy transzmembrán szegmenst és két pórus-formáló hurkot tartalmaz. Így két alegység dimerizálódva hoz létre egy funkcionális csatornát (8).

A csatornák jellemzően az úgynevezett háttérkonduktancia kialakításában játszanak szerepet, azaz a membrán magas  $K^+$  permeabilitásának fenntartása révén stabilizálják a sejtek kellően negatív nyugalmi membránpotenciálját (24). Azonban a korai feltételezésekkel szemben e funkciójukat nem passzívan töltik be, hanem különböző fiziko-kémiai faktorok (pl. pH, hőmérséklet) és jelátviteli folyamatok által szabályozottan. A csatornákat a következő hat alcsaládra oszthatjuk: mechanikusan kapuzott (TREK), lúgosodás-aktivált (TALK),  $Ca^{2+}$ -aktivált (TRESK), gyengén befelé egyenirányító (TWIK), savavasodás-gátolt (TASK) és halotán-gátolt csatornák (THIK) (24). E jellemző tulajdonságok mellett azonban mindegyik csatorna többszörösen szabályozott az említett faktorok által. A legismertebb két pórus-formáló



hurkot tartalmazó csatornák a TREK, TRAAK és TASK csatornák, melyek főként idegsejteken fejeződnek ki (25).

Neuronokban expresszáldva a hő- és fájdalomérzékelésben vesznek részt a TREK csatornák, melyeket emellett kimutattak szívizomsejtekben is, ahol az akciós potenciál lefutását alakítják (24). A TALK csatornák a vesében szerepet játszanak a bikarbonát visszavételében, a hasnyálmirigyben a szekréció szabályozásában, valamint megtalálhatók még a májban is (24). A TRESK csatornák főleg neuronokban található meg, hibás működését migérnekkel hozták összefüggésbe, működése  $\text{Ca}^{2+}$ -függő, ami a kalcineurinon keresztül valósul meg (26, 27). A TWIK csatorna széles szöveti eloszlást mutat emberben, de legnagyobb mennyiségben az agyban és a szívben mutatták ki, mely utóbbiban a szívritmus szabályozásában vesz részt (28, 29). A TASK család tagjai érzékenyek az extracelluláris pH változására, és ennek révén szerepet játszanak a kemoszenzitív sejtek működésében, az ízérzékelésben, továbbá apoptotikus és daganatos folyamatokban (24). A THIK csatornák jelenlétét az agyban és a vesében mutatták ki, de funkciójuk egyelőre nem ismert (24).

#### $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált káliumcsatornák ( $\text{KCa}$ )

A  $\text{KCa}$  csatornákat jellemzően az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint megemelkedése aktiválja, de e család emberi genomában megtalálható 8 tagja közül a  $\text{KCa4}$  és  $\text{KCa5}$  alcsaládokba tartozó három csatorna az intracelluláris  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  szintre és a pH-ra érzékeny a  $\text{Ca}^{2+}$  szint helyett (30). Az e családba tartozó csatornák filogenetikai analízis alapján két csoportra oszthatók. Az egyik csoportot alkotják a kis és közepes konduktanciájú (small / intermediate conductance) SK és IK csatornák, melyek feszültség-függetlenek és alacsony intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció ( $< 1 \mu\text{M}$ ) mellett aktiválódnak. További jellemzőjük, hogy nem közvetlenül, hanem kalmodulinon keresztül kötik a kalcium ionokat. Részt vesznek  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli folyamatokban mind elektromosan ingerelhető, mind nem-ingerelhető sejtekben. Az SK csatornák nevüket az alacsony egyedi csatorna vezetőképességükről kapták. Ide tartoznak a  $\text{KCa2.1}$ ,  $\text{KCa2.2}$  és  $\text{KCa2.3}$  csatornák, melyek megkülönböztető sajátága, hogy gátolhatók apaminnal (30).

A  $\text{KCa3.1}$  csatornát IK, azaz közepes konduktanciájú csatornának is nevezik, utalva arra, hogy az egyedi csatorna konduktanciája az SK (2-25 pS) és a BK (100-300 pS) csatornák értékei közé esik. A  $\text{KCa3.1}$  csatornát többféle szövetben és sejtben kimutatták, például fibroblasztokban, vörösvértestekben, osztódó simaizom sejtekben és limfocitákban (31-34) A

csatorna jellemzően nem expresszálódik ingerelhető sejtekben (szívizom, vázizom, neuron) (35). A  $KCa_{3.1}$  gátlószerek a terápiás alkalmazás lehetőségét hordozzák anémia, asztma, és néhány keringési betegség esetén, illetve bizonyos T és B limfocita alcsoportok aktivációját gátolhatják (35).

A BK („big conductance” = nagy konduktanciájú, MaxiK, Slo,  $KCa_{1.1}$ ) csatorna *Slo* családjába tartoznak a  $KCa_4$  és  $KCa_5$  csatornák, bár ezek biofizikai tulajdonságai meglehetősen eltérnek a névadó csatornáétól. A család legjobban karakterizált tagja a  $KCa_{1.1}$  csatorna, mely feszültség- és  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatorna, azaz mind az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megemelkedése, mind a membrán depolarizációja növeli a csatornák nyitási valószínűségét. Jellemzője az igen magas ( $> 200$  pS) egyedi csatorna vezetőképesség, mely könnyen detektálhatóvá teszi még egyedi csatorna mérések során is (8). Felépítésében is eltér a feszültség-kapuzott csatornák és a többi  $KCa$  csatorna jellemző, alegységenként hat transzmembrán szegmenst tartalmazó szerkezetétől, mivel tartalmaz egy hetedik transzmembrán hélixet (S0) az N-terminális végén. Emberben igen széleskörű a szöveti eloszlása: egyéb szövetek mellett megtalálható az agyban (36), simaizomban (37), vesében (38), cochleában (39) és mitokondriumokban (40) is, valamint számos daganatban is kifejeződik (41).

#### Feszültség-függő káliumcsatornák ( $K_v$ )

A feszültség-függő káliumcsatornákat kódoló gének terméke egy csatorna-alegység ( $K_v1.x-K_v12.x$ ), melyből négy szerelődik össze a funkcionális csatorna létrehozásához. E fehérjék két nagy csoportra oszthatók: a vezetőképes, illetve a nem-vezető (silent) csatornákra. Vezetőképes tetramer csatornákat alkotnak a  $K_v1.x$ ,  $K_v2.x$ ,  $K_v3.x$ ,  $K_v4.x$ ,  $K_v7.x$ ,  $K_v10.x$ ,  $K_v11.x$  és  $K_v12.x$  alegységek, míg a  $K_v5.x$ ,  $K_v6.x$ ,  $K_v8.x$  és  $K_v9.x$  fehérjék erre nem képesek (42). Ez utóbbi alegységek a  $K_v2.x$  alegységekkel heteromerizálódva hoznak létre különböző tulajdonságú funkcionáló csatornákat. Egy adott sejtben többféle  $K_v$  csatorna is kifejeződhet, melyek lehetnek az egy családba tartozó alegységek homo-, vagy heterotetramerei ami különböző biofizikai paraméterek megnyilvánulásához vezet. A heterotetramerizáció mellett egyéb faktorok is növelik a  $K_v$  csatornák működésében megfigyelhető nagyfokú variabilitást. A pórusformáló  $\alpha$  alegységekhez kapcsolódhatnak járulékos alegységek, mint pl.  $K_v\beta$ , KCHIP ( $K^+$  channel interacting protein), KCNE vagy kalmodulin fehérjék (43, 44). Ezeken felül az említett

nem-vezető  $\alpha$ -alegységek, alternatív splicing és poszttranszlációs módosítások is növelik a Kv csatornák működésének sokszínűségét (45).

A feszültség-függő káliumcsatornák (Kv) nyitási valószínűsége a membránpotenciáltól függ. Növekvő depolarizáció hatására a csatornák egyre nagyobb hányada nyit ki, és az ennek hatására kialakuló  $K^+$  kiáramlás hiperpolarizációt létrehozva egy negatív visszacsatolási kört valósít meg a csatornák záródásához vezetve. Tartós depolarizáció során a Kv csatornák egy része egy nem-vezető inaktivált állapotba kerül, melynek mértéke és kialakulásának sebessége nagy szórást mutat. A Kv csatornákat az általuk létrehozott áram kinetikai tulajdonságai alapján klasszikusan két csoportra osztották: A-típusú (gyorsan inaktiválódó), vagy delayed rectifier (lassan, vagy nem inaktiválódó) csatornákra (46). A jellegzetes gyors lecsengésű, A-típusú áramokat generáló csatornák jellemzően ingerelhető – ideg, izom és szívizom sejtekben találhatók meg, ezek a következők: Kv1.4, Kv3.3, Kv3.4, Kv4.1, Kv4.2 és Kv4.3.

A „késői egyenirányító” (delayed rectifier) csatornák depolarizáció esetén a feszültség-függő  $Na^+$  csatornáknál lassabban nyílnak, ezért jellemzően azokhoz képest időben eltolódva hozzák létre a repolarizáló áramot és az akciós potenciál alatt nem inaktiválódnak jelentős mértékben. Ingerelhető sejtekben tehát kinetikai jellemzőiktől függő módon alakítják az akciós potenciál repolarizációs szakaszát (46). Ebbe a csoportba a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv1.7, Kv1.8, Kv2.x és a Kv7.x csatornák tartoznak.

Mind a Kv1.1 és a Kv1.2 csatornák megtalálhatók az agyban, a retinában és vázizomban, míg a Kv1.2 a gerincvelőben és szívizomban is (47-53).

A Kv1.3 csatornák előfordulnak idegsejteken, T és B limfocitákban, makrofágokon, és dendritikus sejtekben (54-58). Több sejten más Kv alegységekkel heteromultimereket alkotva fordul elő (59, 60). E csatornák kritikus szereplői a limfociták aktivációjához és proliferációjához vezető jelátviteli útvonalnak, így az utóbbi években vonzó molekuláris célponttá váltak egyes T-sejt mediált autoimmun betegségek terápiás lehetőségei között (61, 62). A Kv1.3 intracelluláris expresszióját is leírták, ahol mitokondriumokban az apoptózis kiváltásában vehetnek részt (63).

A Kv1.5 csatornák sok egyéb szövet mellett a szívben, vázizomban, a hasnyálmirigyben és makrofágokban is megtalálhatók (49, 60, 64, 65). A Kv1.6 csatornát leírták neuronokban, ahol gyakran formál heteromer csatornákat pl. Kv1.1 és 1.3 alegységekkel, valamint simaizomsejtekben (66-69). A Kv1.7 megtalálható a szívben, ahol hibás működése genetikai

szívbetegségeket okozhat (70), illetve részt vesz a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek inzulin szekréciójában (71).

A  $K_v2.x$  alegységek a fent említett „silent” alegységekkel asszociálva változatos tulajdonságú csatornákat hoznak létre, és szöveti eloszlásuk is széleskörű, megtalálhatók többek között a központi idegrendszer neuronjaiban, szívizomban, és a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben (72-74).

A  $K_v7.1$  csatornák a szívizomsejtek repolarizációjában játszanak kulcsszerepet az akciós potenciál alatt, mutációi hosszú QT szindrómához vezetnek (75-77). A  $K_v7.2$  és  $7.3$  főként az agyban, a  $7.5$  csatornák az agyban és a vázizomban expresszálódnak (78-80), míg a  $K_v7.4$  megtalálható a hallórendszer szőrsejtjeiben és az erek simaizom sejtjeiben (81, 82).

A feszültség-függő  $K^+$  csatornák csoportjába tartozik az EAG (ether-a-go-go) család, melybe a  $K_v10$  (EAG),  $K_v11$  (ERG) és  $K_v12$  (ELK) alcsaládok tartoznak. A  $K_v10.1$  (hEAG) csatorna egészséges emberekben szinte kizárólag az agyban található, de a vizsgált tumorok nagyon nagy hányadában kifejeződik, és funkciója korrelált a tumorok osztódási vagy metasztatikus képességével, így potenciális célponttá vált a daganatterápiában (83-85). A  $K_v11.1$  (hERG) csatorna a szívizom akciós potenciáljának kialakításában játszik kritikus szerepet, és a  $K_v7.1$ -hez hasonlóan mutációi hosszú QT szindrómához vezethetnek (77, 86). Mivel potenciális gyógyszermolekulák széles spektruma képes gátolni, és ezzel a szív működési zavarát okozni, e molekulákat a fejlesztés korai szakaszában tesztelni szükséges hERG gátlás szempontjából (87). Az ELK család tagjai az agyban fejeződnek ki, ahol a sejtek ingerelhetőségét szabályozzák (88, 89).

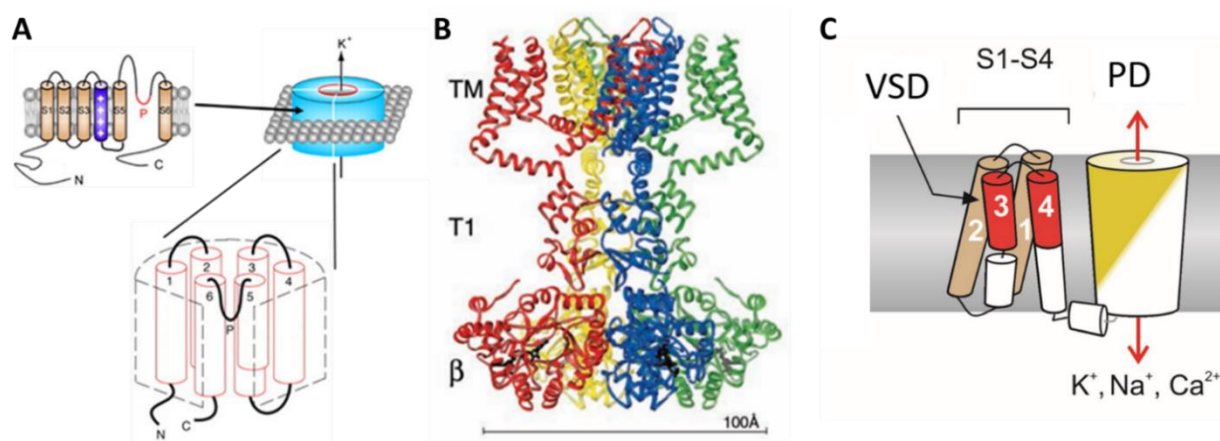
### 2.1.2 A feszültség-függő $K^+$ csatornák szerkezeti sajátosságai és kapuzása

A  $K_v$  csatornák szerkezetének és működésének kutatása során hatalmas mennyiségű információ származik a *Drosophila melanogaster* feszültség-kapuzott  $K^+$  csatornája, a *Shaker* csatorna vizsgálatából. A *Shaker* csatorna közeli rokonságban áll az emlős  $K_v1.x$  csatornákkal (melyeket a *Shaker* család tagjainak nevezünk), és az egyik leggyakrabban alkalmazott modell-rendszer, melyet részben könnyű kezelhetőségnek és a különböző expressziós rendszerekben jó kifejezhetőségének köszönhet. Nevét onnan kapta, hogy a *Drosophila* lábai kontrollálatlanul

ráanganak éter anesztézia alatt, ha az állat a *Shaker* csatorna bizonyos mutáns változatait hordozza, melyek módosítják az akciós potenciál tulajdonságait (90).

Óriási előrelépés volt a  $K_v$  csatornák szerkezetének feltárásában, hogy 2005-ben a Mackinnon munkacsoport meghatározta a  $K_v1.2$  csatorna röntgen-krisztallográfiás szerkezetét (91), mely alapján mára egy igen részletes modell alakult ki a  $K_v$  csatornák szerkezetéről.

A tetramer csatornát az alegységek közötti nem-kovalens kötések tartják össze (92). Minden alegység 6 transzmembrán  $\alpha$ -helikális szegmensből és az azokat összekötő intra- és extracelluláris hurkokból tevődik össze (1. ábra). A csatorna ionvezetésért felelős pórus doménjét (PD) az 5. és 6. transzmembrán szegmensek (S5 és S6) közötti extracelluláris hurkok valamint az S6 szegmensek egyes részei együttesen hozzák létre (93). A csatorna ugyanezen régiójához kötődik a  $K_v$  csatornák számos peptid és kis-molekula gátlószere is. A membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzor doménjei (voltage-sensor domain = VSD) érzékelik, mely minden alegységben az S1-S4 hélixeket foglalja magában.



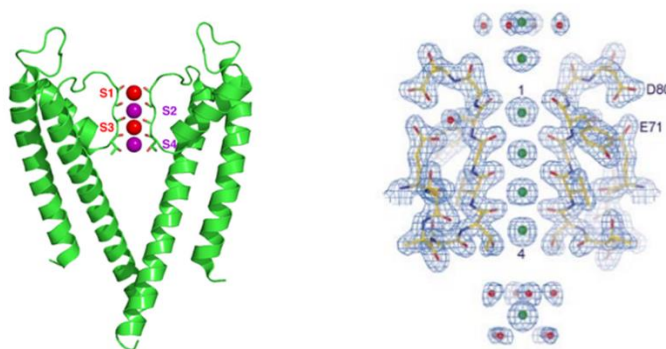
**1. ábra A  $K_v$  csatornák szerkezete.**

(A) Négy, egyenként hat transzmembrán hélixet tartalmazó, alegység együtt hoz létre egy funkcionális  $K_v$  csatornát. (B) A T1 tetramerizációs domén segíti az egy családba tartozó  $K_v$  alegységek összeszerelődését, míg az intracelluláris  $\beta$  alegységek módosítják a csatornák tulajdonságait. (C) Egy alegységen belül az S1-S4 hélixek hozzák létre a feszültség-érzékelő (VSD) domént, mely az S4-S5 összekötővel kapcsolódik a pórus doménhez (PD), amit az S5-S6 hélixek és az azokat összekötő hurok alakít ki.

A pórusrégió tartalmazza a  $K^+$  szelektivitást biztosító szelektivitási szűrő (TVGYG) szekvenciát is, mely nagymértékben konzervált a  $K^+$  csatornák között, néhány kivételtől eltekintve (pl. a  $K_v11.1$  csatorna SVGFG szekvenciája (94), illetve kisebb eltérések a két pórus-

formáló hurkot tartalmazó csatornában). A szelektivitási szűrő a pórus legszűkebb szakasza, melyen a dehidrált  $K^+$  ionok egyesével haladhatnak át, és ahol a csatorna nagy  $K^+$  szelektivitása megvalósul a többi ionnal szemben. Az itt elhelyezkedő aminosavak elektronegatív karbonil oxigénatomjai fordulnak a pórus belseje felé, és pótolják az ionok dehidratációja során elvesztett vízmolekulákat. A jól meghatározott távolságban elhelyezkedő karbonil oxigének ezáltal kötőhelyeket hoznak létre a  $K^+$  ionok számára, s így a szűrőbe történő belépésük energetikailag kedvező lesz a hidratburok elvesztése ellenére. Ez a magyarázata, hogy a  $K^+$  ionoknál kisebb méretű  $Na^+$  ionok nem jutnak át jelentős számban a szűrőn: a  $K^+$  méretéhez „tervezett” karbonil oxigének túl távol vannak a  $Na^+$  számára ahhoz, hogy energetikailag hatékonyan pótolják a vízmolekulákat (95). A bakteriális pH-kapuzott KcsA és a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák kristályszerkezete alapján a csatornák pórusa négy szekvenciális  $K^+$  kötőhelyet tartalmaz (2. ábra), ezen kívül egy extracelluláris rehidrációs/dehidrációs kötőhelyet is feltételeznek (93, 96). A szűrőben jelen lévő négy kötőhely közül ionáramlás esetén jellemzően két kötőhely betöltött, és a dehidrált ionok közötti elektrosztatikus taszítás teszi lehetővé a nagy szelektivitás mellett is az igen nagy, akár  $10^7$ - $10^8$  ion/s sebességű áramlást.

A szelektivitási szűrő az intracelluláris végén egy üregbe szélesedik, ahol a  $K^+$  ionok még hidratált állapotban vannak. Az üreget az intracelluláris oldalon az aktivációs kapu zárja le. Az aktivációs kaput a pórus intracelluláris végét szegélyező S6 szegmensek kereszteződése hozza létre. Egy erősen konzervált Pro-Val-Pro motívum egy flexibilis régiót, „zsanért” hoz létre, ahol az aktivációs kapu nyílása és zárása valósul meg, ahogy a kapuzás során törés jön létre az S6 szegmensekben (97).

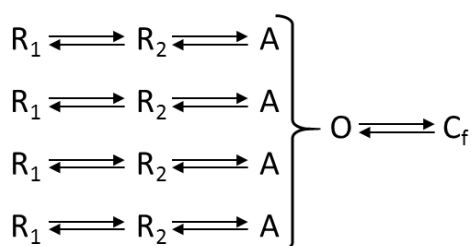


## 2. ábra A KcsA bakteriális pH-kapuzott $K^+$ csatorna kristályszerkezete.

(A) A KcsA nem rendelkezik VSD-vel, csak a  $K_v$  csatornák pórus doménjének megfelelő régiókkal. A szelektivitási szűrő négy kötőhelyet tartalmaz a  $K^+$  ionok számára (S1-S4). (B) Az extracelluláris oldalon feltételezhető egy dehidrációs / rehidrációs kötőhely is, míg az intracelluláris oldalon a szelektivitási szűrő alatti vízzel telt üregben hidratálva vannak jelen a  $K^+$  ionok.



A  $K_v$  csatornák a membrán depolarizációjára nyitnak ki, és mivel számos típusuk részt vesz az akciós potenciál alakításában, e feszültség-függésnek meredeknek kell lennie, hogy szűk membránpotenciál tartományban működjenek, és gyors kapuzást tegyenek lehetővé. A feszültség-függő csatornában a membránpotenciál változásaira konformáció-változással reagáló VSD S1-S4 hélicei közül különös jelentősége van a több pozitív töltésű aminosav oldalláncot hordozó S4 hélixnek, melynek elmozdulását indukálja a membrán depolarizációja (98, 99). A membránpotenciál-változás hatására az S4-ben elmozduló töltések hozzák létre a mérhető „kapuzási áramot”, melynek kinetikája jellemzi a kapuzási konformáció-változás sebességét, integrálja, a „kapuzási töltés” pedig az elmozduló töltés mennyiségével és a csatornák számával arányos (100, 101). A VSD depolarizáció hatására létrejövő konformáció-változása csatolás (coupling) révén áttevődik a PD-re a csatorna aktivációs kapujának nyitását eredményezve (91, 102, 103). A különböző feszültség-protokollok során mért ion- és kapuzási áramok alapján több különböző sémát javasoltak az évek során az aktiváció alatt végbemenő kapuzási lépések leírására, melyeket Zagotta és mtsai. (104, 105) hasonlítottak össze átfogóan a *Shaker* csatornán. Mérési eredményeikkel összevetve a modellek alapján szimulált áramgörbéket, azt a sémát találták a legmegfelelőbbnek, mely szerint minden alegység VSD-je két, meghatározott sorrendű konformáció-változáson megy keresztül az aktivált állapot eléréséhez. A pórus nyitása pedig akkor történhet meg, amikor mind a négy VSD aktivált állapotba került. A modell tartalmaz egy viszonylag instabil zárt állapotot, amelybe nyitást követően léphet a csatorna, és az átmenet elenyésző feszültség-függése miatt valószínűleg a pórus gyors billegését jelenti a két állapot között a VSD-k aktivált állapota mellett (3. ábra).

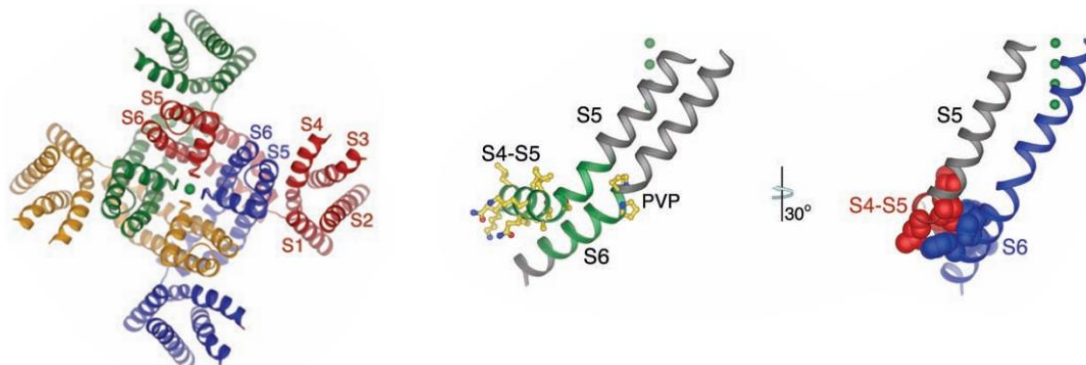


### 3. ábra A $K_v$ csatorna kapuzás „determinisztikus” modellje.

Minden VSD a nyugalmi állapotból ( $R_1$ ) két lépésben éri el a teljesen aktivált állapotát (A), és a pórus csak a mind a négy VSD aktivációját követően nyílhat ki (O). A csatorna a VSD-k aktivált állapota mellett billeghet a nyitott és egy további instabil zárt állapot ( $C_f$ ) között.

A  $K_v1.2$  csatorna röntgen-krisztallográfiás képe alapján felállított modell szerint a VSD-PD csatolás egy közvetlen merev kapcsolat a folytonos polipeptid-lánc S4-S5 összekötő szakasza (linker) révén (102). A viszonylag hosszú linker lehetővé teszi a „domén-felcserélt” elrendezést, ami azt jelenti, hogy a VSD egy másik alegységhez tartozó PD mellett helyezkedik

el, és nem az S4-S5 linker után folytatódó ugyanazon alegységhez tartozó PD mellett (4. ábra). A modell szerint a depolarizáció okozta VSD konformáció-változást az S4-S5 összekötő egy emelőként közvetíti a pórus felé, ami az aktivációs kapu nyitásához vezet.



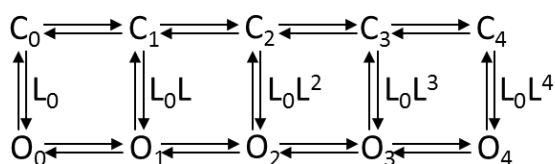
#### 4. ábra A Kv1.2 kristályszerkezete.

(A) Az egyes alegységeket különböző színek jelölik. S1-S6 jelöli az egyes transzmembrán héliceket egy alegységen belül. (B) Az S4-S5 összekötő kapcsolja össze a VSD-t és PD-t. A PVP motívum mentén jön létre a törés, ami zárja a csatorna kapuját. Látható a domén-felcserélt elrendezés.

Újabb eredmények szerint azonban különböző Kv csatornáknak e csatolás lehet lényegesen lazább, mint a modell sejteti, és pórus nyílása megtörténhet mind a négy VSD aktivációját megelőzően is (106). Ezen allosztérikus modell szerint az egyes VSD-k aktivációja növeli a pórus nyitási valószínűségét, de nem szükségszerű mind a négy aktivált állapota a pórus nyitásához. Zagotta és mtsai. (105) vizsgálták ennek a modellnek az alkalmazhatóságát is a *Shaker* csatornára, és nem találták megfelelőnek a kapuzás leírására. Ez arra utal, hogy különböző családba tartozó Kv csatornák csatolása eltérő lehet: míg a *Shaker* lineáris vagy determinisztikus sémát követ, addig például a Kv7.1 csatorna allosztérikus módon aktiválódik. A közvetlen merev VSD-PD kapcsolat helyett a csatolás igényelheti lipidek jelenlétét is, mint például a Kv7.1 csatorna esetén, ahol a VSD mozgása csak akkor közvetítődik a PD felé, ha a csatorna egy adott kötőhelyéhez foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2) kötődik (107). A Kv7.1 kapuzását leíró kapuzási séma szerint az egyes VSD-k aktivációja egy *L* allosztérikus faktorral növeli a pórus nyitásának valószínűségét, azaz minél több VSD aktiválódott, annál nagyobb a nyitás valószínűsége, viszont a nyitás lehetséges – bár igen valószínűtlen – akár egyetlen VSD aktivációja nélkül is (5. ábra).



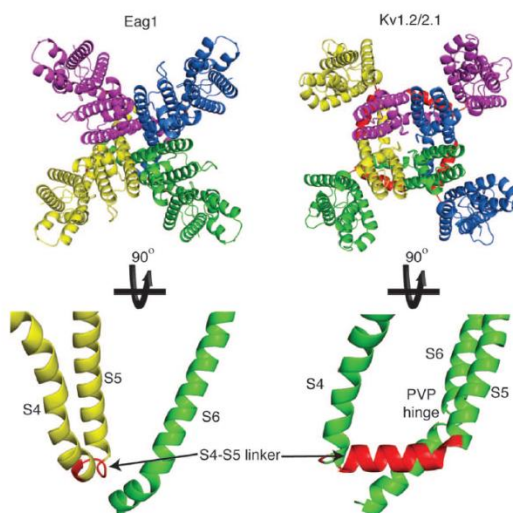
### 5. ábra A Kv7.1 csatorna allosztérikus kapuzási sémája.



A jobbra történő lépések az egyes VSD-k aktivációját jelentik, melyek történhetnek a pórus zárt (C), vagy nyitott állapota (O) mellett is. A lefelé irányuló lépések a pórus nyitását jelzik. A pórus nyitása egyetlen VSD aktivációja nélkül is megtörténhet, de valószínűsége  $L$ -szeresére nő minden VSD aktivációjával.

Igen meglepő módon, a polipeptid lánc folytonossága sem nélkülözhetetlen kritériuma a csatolás létrejöttének, ahogyan azt a Kv10.1 csatorna példája mutatja (108). Német kollaborátoraink (Luis Pardo, Göttingen) azt találták, hogy ha a csatornafehérjét „kettévágva”, két félként expresszálták, akkor is funkcionáló, és feszültség-kapuzott csatornát kaptak. Sőt, a csatolást elvileg megvalósító S4-S5 linker teljes kivágása után is feszültség-kapuzott csatornaként működött a fehérje. A közelmúltban a Nobel-díjas Roderick MacKinnon laboratóriumában megoldották a Kv10.1 szerkezetét krio-elektronmikroszkópiával, mely több jelentős eltérést mutatott az eddig ismert Kv csatorna struktúrákhoz képest (109). Lényegesen rövidebb például az S4-S5 linker, és így nem „domén-felcserélt” elrendezésben vannak egymáshoz képest a VS és P domének, mint a korábbi ismert Kv csatornák esetén (6. ábra). Így könnyebben érthető, hogy az azonos alegységhez tartozó VSD-k és PD-k közelsége olyan csatolási mechanizmusokat is megvalósíthat, amik a „hagyományos” elrendezés esetén nem lehetségesek. Ezen strukturális különbségek ismeretében nem meglepő a kinetikai modellek vált

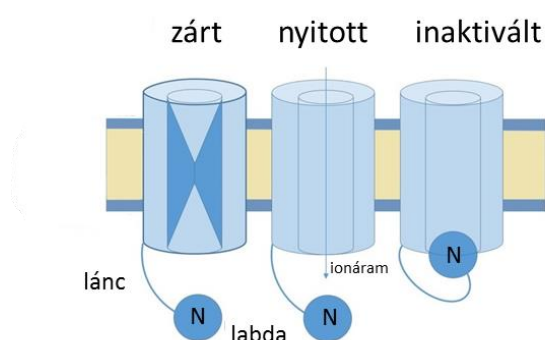
### 6. ábra A Kv10.1 csatorna hagyományostól eltérő szerkezete.



A Kv10.1 (Eag1) csatornában az S4-S5 összekötő (alsó panel, piros) jóval rövidebb, mint a legtöbb egyéb Kv csatornában, például a Kv1.2/2.1 kimérában. Az utóbbi típus lehetővé teszi a „domén-felcserélt” elrendezést (felső panel), amikor az egyik alegység VSD-je a szomszédos alegység PD-je mellett helyezkedik el, míg az Eag1 rövid összekötője miatt nem cserélődnek fel a domének, így az adott alegység VSD-je és PD-je egymással szomszédos. Ez lehetővé teheti a hagyományostól eltérő kapuzási mechanizmust.

Hosszan tartó depolarizáció esetén a Kv csatornák többsége egy nem-vezető inaktív állapotba lép, mely az A-típusú áramot létrehozó csatornáknál az intracelluláris oldalon történik

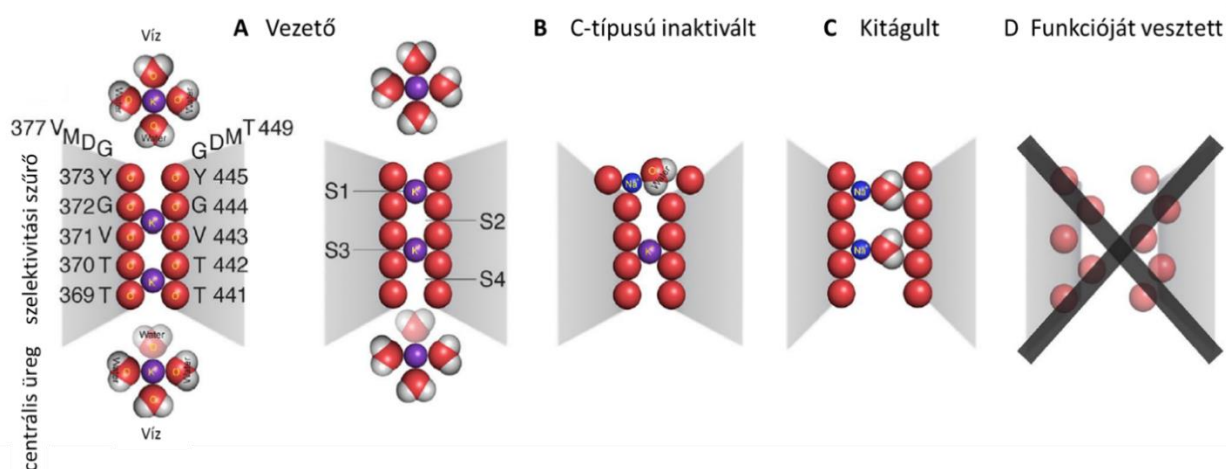
gyors, N-típusú inaktiváció révén. Ez a mechanizmus hasonló a szintén gyorsan inaktíválódó feszültség-függő  $\text{Na}^+$  csatornák inaktivációjához, és a „ball and chain”, azaz „labda és lánc” nevet viseli. A név onnan ered, hogy  $\text{K}_v$  csatornák esetén a fehérje N-terminális végén elhelyezkedő aminosavak egy peptid „labdát” alkotnak, mely egy további, hosszabb peptid láncsal csatlakozik a csatorna többi részéhez (7. ábra). Depolarizáció során, az aktivációs kapu nyitását követően, a labda elektrosztatikus kölcsönhatás révén a pórusba kötődik, ezáltal elzárva a  $\text{K}^+$  ionok áramlását (110).



### 7. ábra Az N-típusú inaktiváció modellje.

Az N-típusú inaktivációt mutató  $\text{K}_v$  csatornák N-terminálisán egy „labdát” alkotó peptid régió bekötődik a pórus intracelluláris végébe a csatorna nyitását követően, így a csatorna nem-vezetővé válik még fennálló depolarizáció esetén is. Az inaktivációs labda jelen van mind a négy alegységen, így egy csatornának 4 inaktivációs labdája van, de egyetlen is elegendő az inaktivációhoz.

Sok  $\text{K}_v$  csatornánál létezik egy másik mechanizmusú, ún. C-típusú, lassabb inaktivációs mechanizmus, mely a szelektív szűrőben, a pórus extracelluláris végén gátolja meg az ionáramlást (111). A depolarizáció által indukált VSD elmozdulás átrendezi a szelektív szűrőben elhelyezkedő aminosavak hidrogénkötés-hálózatát, ami végül a szűrőt egy olyan állapotban stabilizálja, mely a legkülső  $\text{K}^+$  kötőhelyet kitágítja. Az így kitágult kötőhely nem képes a  $\text{K}^+$  iont komplexálni, s ezáltal megszűnik a  $\text{K}^+$  ionok áramlása, kialakul a C-inaktivált állapot (8. ábra).  $\text{K}^+$  ionok hiányában a teljes szűrő kitágul a karbonil oxigének taszítása miatt, és ilyenkor a  $\text{K}^+$  csatorna képes  $\text{Na}^+$  vagy egyéb, nagyobb méretű ionokat vezetni (112).



### 8. ábra A $K_v$ csatorna szelektivitási szűrője különböző vezetési állapotokban.

(A) Vezető állapotban a belső üregből a szűrőbe lépő  $K^+$  ion elveszti hidratburkát. Vezető állapotban két kötőhelyen van  $K^+$  ion, a 4,2 és 3,1 állapotok között oszcillál a betöltöttség. A szűrőből kilépve újra hidratálódik az ion. (B) C-típusú inaktivált állapotban az 1-es kötőhely kitágul, nem képes  $K^+$  iont komplexálni, így fogadni  $K^+$  iont a 2-es kötőhelyről, ezért megszűnik a vezetés. (C) A  $K^+$  ionok teljes hiányában a szűrő kitágul teljes hosszában a karbonil oxigének taszítása miatt. Ez lehetővé teszi hidratált  $Na^+$  ionok vagy más nagy méretű kationok átjutását. (D) Hosszabb  $K^+$  hiányos állapotban a szűrő teljesen elveszti szerkezetét és funkcióját és nem-vezetővé válik.

Mivel tehát a C-típusú inaktiváció sebességét a legkülső  $K^+$  kötőhely betöltöttsége határozza meg, minden ezt befolyásoló faktor módosíthatja az inaktivációs kinetikát. E faktorok közé tartoznak a pórus kijáratánál található aminosavak, az oldatok ionösszetétele (elsősorban  $K^+$  koncentrációja) és pH-ja, valamint gátlószerek jelenléte (113-115). Mivel az inaktiváció sebessége meghatározza az átáramló  $K^+$  ionok mennyiségét, s így kihat számos membránpotenciál-függő sejtfunkcióra, a fiziológiás és kóros körülmények során lokálisan kialakuló ionkoncentráció és pH változások a  $K_v$  csatorna kapuzáson keresztül módosíthatnak élettani folyamatokat.

Hosszan tartó depolarizációt követően megfigyelték a kapuzási töltések „immobilizációját”, azaz a depolarizáció hosszával összefüggő lassabb visszatérését a repolarizáló impulzus alatt. Ezt a lassulást először  $Na^+$  csatornákon írták le (116), és a gyors N-típusú inaktivációhoz kapcsolták. Ugyanez a jelenség megfigyelhető volt gyors inaktivációval rendelkező *Shaker*  $K^+$  csatornákon (117), és azzal magyarázták, hogy N-típusú inaktiváció során az N-terminus labdája kölcsönhat a feszültség-szenzorral, lassítva annak visszatérését a nyugalmi állapotba. Később azonban az is kiderült, hogy nem szükséges a gyors inaktiváció jelenléte az immobilizáció kialakulásához, hiszen azt megfigyelték gyors inaktivációval nem, csak lassú, C-típusú inaktivációval rendelkező H4- $\Delta$  *Shaker* és  $K_v1.5$  csatornákon is (118, 119). E megfigyelések arra utalnak, hogy a pórus állapota visszahat a VSD-kre, és módosíthatja azok mozgását.

#### 2.1.3 A $K_v$ csatornák kapuzásának pH függése

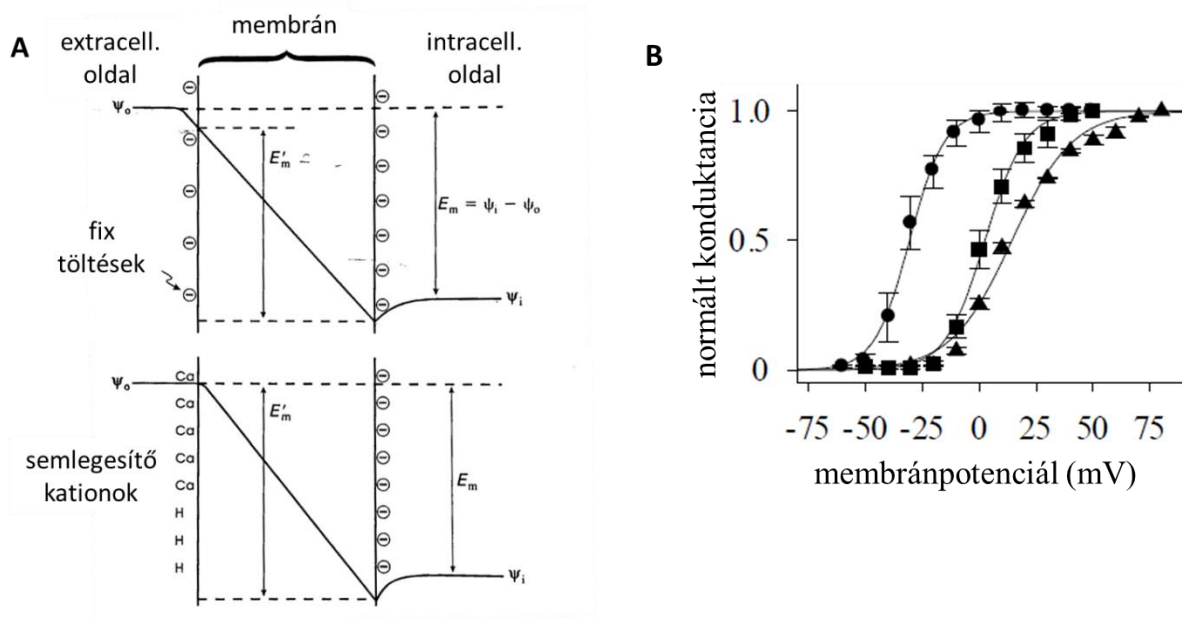
Jól ismert, hogy fiziológiás rendszerekben a proton koncentráció megváltozásának, különösen a savasodásnak, jelentős hatása lehet a sejtek ingerelhetőségére (46). Szinte minden

eddig vizsgált ioncsatorna működését befolyásolta bizonyos mértékig a proton koncentráció, gyakran a fiziológias pH tartományon belül. Legtöbb esetben a savasítás az ionáram csökkenését okozza a pórus blokkolása vagy a kapuzás módosítása révén. A szekvenciában található hisztidinek fontos szerepet játszanak az ioncsatornák pH szabályozásában, mivel pKa értékük közel esik a fiziológias pH tartományhoz. A T-limfociták Kv1.3 csatornájának C-típusú inaktivációját például egy, a pórus extracelluláris végénél található hisztidin oldalláncon keresztül szabályozza a külső pH (lásd később) (120, 121). Az ennek megfelelő pozícióban levő treonint hisztidinre cserélve a *Shaker* csatornában, annak inaktivációja is pH függővé válik a fiziológias tartományban (114). Sőt egy, a pórustól ennél távolabbi pozícióban, az úgynevezett toronyrégióban elhelyezkedő aminosav hisztidinnel való helyettesítése is hasonló eredményre vezetett (122).

A Kv1.2 és Kv1.5 csatornák pH érzékenységekben megfigyelhető különbséget is a Kv1.5 csatorna S5 hélixét és pórusdoménjét összekötő linkerben található hisztidinek tulajdonították, ami szintén a C-típusú inaktivációt befolyásolta (123). Az idegszövetben és a szívben megtalálható Kv1.4 csatornák pH regulációja az N-típusú inaktivációból történő hisztidin-mediált visszatérésén keresztül valósul meg (124). Az alacsony pH nem csak a C-típusú inaktiváció sebességét gyorsítja fel a nyitott állapotból a Kv1.4-ben, hanem a zárt inaktivált állapotokat is stabilizálja (125). A fiziológias pH tartományban történő protonáció nem korlátozódik azonban a hisztidinre: egyéb aminosav oldalláncok kombinációja (pl. argininnel vagy lizinnel) kialakíthat olyan lokális környezetet, melyben a látszólagos pKa jelentősen eltér a szabad aminosav esetén mérhetőnél, s így interakciós helyek alakulhatnak ki a protonok számára.

A protonok ioncsatornákkal létrejövő specifikus kölcsönhatásain túl savas környezetben fellép a nem-specifikus felszíni töltésárnyékoló hatás is minden feszültség-függő folyamatnál, így a feszültség-függő ioncsatornák kapuzása során is. Jól ismert például, hogy az extracelluláris oldal savasítása eltolja a feszültség-függő csatornák aktivációs küszöbét depolarizált irányba a felszíni potenciál megváltozása miatt (120, 126, 127). A jelenség magyarázata, hogy a membrán külső felszínén elhelyezkedő negatív töltéseket a külső oldatban nagy koncentrációban jelenlevő divalens kationok (pl.  $\text{Ca}^{2+}$  vagy  $\text{Mg}^{2+}$ ) vagy protonok semlegesítik, és ezáltal növelik a lokális elektromos potenciált. E potenciál változás a membrán közeli környezetében történik, és így nem változtatja a két oldal között elektródákkal, az oldatokban mérhető potenciálkülönbséget,

viszont növeli a membrán két felszíne közötti különbséget, azaz a membránon keresztül negatívabb membránpotenciál jelenik meg (9. ábra). A membránba ágyazott feszültség-érzékeny fehérjék ezt a potenciálkülönbséget detektálják, s így az elektródákkal mérhető membránpotenciálnál lényegesen, akár 30-40 mV-tal, negatívabb membránpotenciált érzékelhetnek, ami drasztikusan módosíthatja a kapuzásukat. Végül pedig, a protonok, kationok lévén, kölcsönhathatnak a csatornán permeáló egyéb kationokkal. A protonok rendkívül gyors diffúzióra képesek a Grotthuss mechanizmus révén vízmolekulák folytonos láncolatán keresztül (128), így könnyen bejuthatnak a pórus vizet tartalmazó szakaszaiba, ahol közvetlenül befolyásolhatják a permeáló ionok fluxusát.



### 9. ábra A felületi töltés-árnyékolás hatása.

(A) A membrán extracelluláris felszínén levő negatív töltéseket a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  vagy  $\text{H}^+$  ionok semlegesítik, így megnövelik a felszíni potenciált. Ez nem módosítja a két oldal között mérhető  $E_m$  membránpotenciált, viszont megnöveli a felszínek között mérhető  $E'_m$  feszültség abszolút értékét, azaz a membránba ágyazott fehérjék negatívabb feszültséget érzékelnek az extracelluláris nulla szinthez képest. (B) Vad-típusú CTLL-2 sejtekben expresszált hKv1.3 csatornák konduktanciájának feszültség-függése standard extracelluláris oldatban pH 7,35 (körök) és pH 5,5 (négyzetek) esetén, valamint emelt ionerősségű (96 mM  $\text{MgCl}_2$ ) oldatban pH 7,35 esetén. Mindkét kezelés jelentős mértékben ( $> 30$  mV) jobbra tolta a G-V függvényt a kontrollhoz képest.



#### 2.1.4 A Kv1.3 szerepe T sejtekben

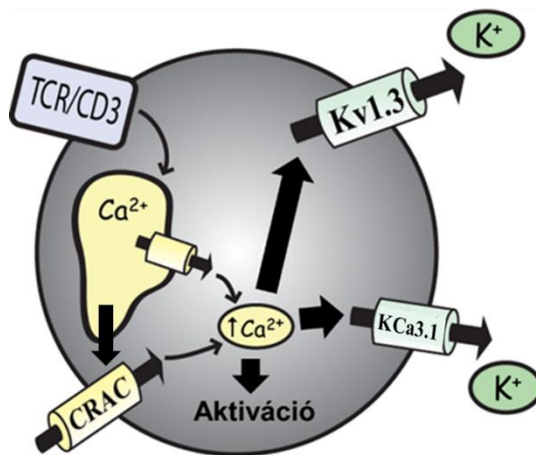
A Kv csatornák legismertebb funkciója az ingerelhető sejtekben az akciós potenciál (AP) repolarizációs fázisának létrehozása, és az AP alakjának alakítása. Ugyanakkor számos nem-ingerelhető sejtben vesznek részt kritikus sejtfunkciókban, mint például a sejt proliferációban.

A T-limfocitákon kifejeződő ioncsatornák közül elsőként a feszültség-függő Kv1.3 csatornát írták le, melyről korán bebizonyosodott, hogy működése kulcsszerepet játszik a sejtek aktiválódásában és proliferációjában (54, 129). A Kv1.3 csatorna -60 mV-os membránpotenciál érték felett aktiválódik, melynek következtében a csatornán kiáramló kálium ionok a membránt hiperpolarizálják, így fő funkciója a negatív membránpotenciál stabilizálása (2). A T-sejteken a feszültség-függő Kv1.3 mellett kifejeződik a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált KCa3.1  $\text{K}^+$  csatorna is, mely aktiválódását az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció 200 nM-os érték fölé emelkedése váltja ki (34). A két említett csatorna típuson kívül több egyéb csatorna jelenlétét is kimutatták a T-sejtek plazmamembránjában. Ezek az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak kiürülése által aktivált  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák (Calcium Release Activated Channels = CRAC), a membránfeszülés-aktivált  $\text{Cl}^-$  csatornák, többféle TRP csatorna, két pórus-formáló hurkot tartalmazó  $\text{K}^+$  csatornák, illetve feszültség-aktivált  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák (130).

A T-sejtek specifikus antigénekkal történő találkozását klonális proliferáció követi, mely során az osztódó sejtek effektor memória, vagy hosszú életű centrális memóriá sejtekké differenciálódnak, biztosítva az immunrendszer adaptivitását. Az antigén felismerését a TCR/CD3 receptor komplex biztosítja, mely a specifikus ligandját megkötve olyan intracelluláris jelátviteli kaszkádot indít el, melynek eredménye az intracelluláris szabad kalciumkoncentráció kétfázisú megemelkedése. A folyamat során először intracelluláris hírvivő, inozitol trifoszfát ( $\text{IP}_3$ ) szabadul fel, melynek hatására az intracelluláris kalciumraktárak ürülnek az endoplazmás retikulum membránjában található  $\text{IP}_3$  receptorokon keresztül. Ezt követően további  $\text{Ca}^{2+}$  ionok áramlanak a sejtbe az extracelluláris térből a plazmamembránban található CRAC csatornákon keresztül (131). A CRAC csatornán átfolyó áramot az Orai1 és STIM1 fehérjék asszociációja aktiválja. Az Orai1 fehérjék a plazmamembránban, míg a STIM1 fehérjék az endoplazmás retikulum membránjában találhatóak. Az endoplazmás retikulumból történő  $\text{Ca}^{2+}$  kiürülést a STIM1 fehérje a retikulum lumenje felé néző ún. EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$  szenzor alegységével képes érzékelni, majd az Orai1 fehérjék tetramerizálásával a CRAC csatornák aktiválódását indítja be (132).

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedése a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplexhez és a kalcineurinhoz kapcsolt jelátviteli útvonalakat indít el. Ez utóbbi foszfatáz defoszforilálja az NFAT (nuclear factor of activated T cells) transzkripció faktorát, mely lehetővé teszi annak dimerizálódását és magi transzlokációját. Ezt követően az NFAT már képes kötődni a T-sejtek citokin termelésében és proliferációjában résztvevő gének promóter régiójához és létrejöhet a sejtek osztódáshoz, illetve differenciálódáshoz szükséges gének aktiválódása (133, 134).

A kalcium beáramlása a sejtmembránt depolarizálja, mely nem kedvez a hosszan tartó  $\text{Ca}^{2+}$  jel kialakulásának. Ezt a depolarizáló hatást küszöbölik ki a plazmamembrán káliumcsatornái, melyeken keresztül kiáramló  $\text{K}^+$  ionok az osztódáshoz szükséges negatívabb membránpotenciált stabilizálják. A  $\text{Kv}1.3$  a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás által okozott depolarizáció miatt aktiválódik, míg a  $\text{KCa}3.1$  csatornákat maga a  $\text{Ca}^{2+}$  szint növekedése aktiválja (10. ábra). A káliumcsatornák farmakológiai gátlásával megszűnik a repolarizáló áram, így a sejtek depolarizálódnak, és ennek következtében aktivációjuk nem megy végbe (54, 129).



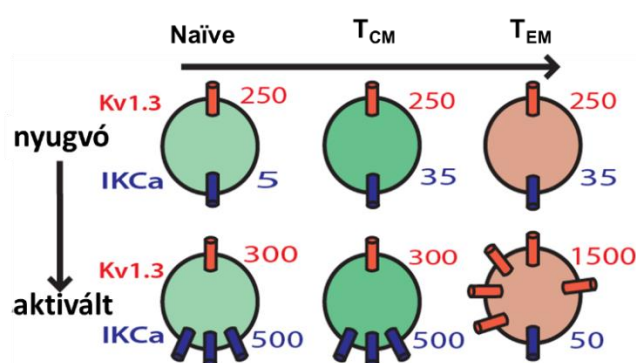
**10. ábra Ioncsatornák szerepe a T-sejt aktivációjában.**

A T-sejt receptor (TCR) aktivációját követően  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás történik az intracelluláris raktárakból, melyek ürülése  $\text{Ca}^{2+}$  belépést indukál az extracelluláris térből a CRAC csatornákon keresztül. Az ezzel járó  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedés aktiválja a  $\text{KCa}3.1$  csatornákat, míg a kiváltott depolarizáció a feszültség-kapuzott  $\text{Kv}1.3$  csatornákat. E két csatornán keresztül a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást kompenzáló  $\text{K}^+$  efflux jön létre, ami stabilizálja a membránpotenciált, és lehetővé teszi a hosszantartó  $\text{Ca}^{2+}$  jel kialakulását.

Differenciáltsági állapotuktól függően a különböző funkciójú T-sejteken a feszültség- és kalcium-függő káliumcsatornák eltérő arányban expresszálódnak. Az utóbbi években számos autoimmun megbetegedésnél mutatták ki  $\text{Kv}1.3^{\text{magas}}$   $\text{CCR7}^-$  fenotípusú effektor memória T-sejtek jelenlétét a gyulladás helyén, valamint azt, hogy szklerózis multiplexben, I-es típusú diabéteszben és reumatoid artiritiszben szenvedő betegekből származó, szöveti infiltrációt mutató autoreaktív T sejtek is ilyen fenotípusúak (135-137).

Az aktivált  $\text{CCR7}^-$  (7-es típusú C-C kemokin receptort nem expresszáló) effektor memória T-sejtek a feszültség-függő  $\text{Kv}1.3$  csatornákat nagy számban, míg a  $\text{KCa}3.1$  csatornákat kis

mértékben fejezik ki (11. ábra), így esetükben a  $K_v1.3$  csatorna a meghatározó eleme a membránpotenciál stabilizálásának, ami szükséges feltétele az aktivációs program teljesülésének (135). Az aktivált  $CCR7^+$  naiv és a centrális memória T-sejtek ( $T_{CM}$ ) plazmamembránjának meghatározó káliumcsatornája a  $Ca^{2+}$ -aktivált  $KCa3.1$ , mely mellett csak kis mennyiségben fordul elő a  $K_v1.3$  csatorna (135, 138). Ebből következik, hogy a  $K_v1.3$  csatornák gátlásával a  $T_{EM}$  sejtek aktivációja szelektíven gátolható, ezért a specifikus  $K_v1.3$  csatorna gátlószerek az autoimmun megbetegedések terápiájának új lehetőségét hordozzák magukban. Az is bebizonyosodott, hogy a nagyszámú funkcionális  $K_v1.3$  csatorna szükséges a  $T_{EM}$  sejtek aktivitásának és magának a  $T_{EM}$  fenotípusnak a fenntartásához, ugyanis lenti-virális domináns negatív technikával elnyomva a  $K_v1.3$  aktivitását a  $T_{EM}$  sejtek nagy része revertált centrális memória sejté (139). Sőt,  $K_v1.3$  knock-out egerekben jelentősen csökkent az infiltráló T-sejtek száma peptiddel indukált EAE esetén, és ezzel együtt a betegség incidenciája és súlyossága (140). Az állatokban kialakult továbbá egy szuppresszív tulajdonságokkal bíró, az anti-inflammatorikus citokint, IL-10-et szekretáló T-sejt populáció is. Ezek mellett a  $K_v1.3$  gátlószerek nem gátolták a  $T_{CM}$  és naiv T-sejtekhez kapcsolható immunfolyamatokat (136).



**11. ábra  $K^+$  csatornák nyugvó és aktivált T-sejteken.**

Nyugvó T-sejteken a  $K_v1.3$  csatorna határozza meg a membránpotenciált. Aktivációt követően a naiv és központi memória sejtekben elsősorban a  $KCa3.1$  ( $IKCa1$ ) csatornák száma nő meg jelentősen, míg az effektor memória sejtekben a  $K_v1.3$  csatornák száma sokszorozódik meg, így az válik dominánssá a membránpotenciál szabályozásában.

Ezen megfigyelések gyakorlati bizonyítékaul szolgálnak azon autoimmun és gyulladásos betegségek állatmodelljei, melyekben sikerrel alkalmaztak  $K_v1.3$  gátlószereket a betegség tüneteinek enyhítésére. Ezek közé tartozik a krónikus relapszáló-remittáló kísérletes autoimmun encefalomyelitisz (CR-EAE) és az adoptív EAE, a pristán-indukált arthritisz (PIA), a késői hiperszenzitivitási reakció (DTH) (141), az allergiás kontakt dermatitisz (142), a spontán autoimmun diabetesz (136) és az allergiás asztma is (143). Ezekben az esetekben peptid gátlószerekkel, vagy kis molekulájú gátlószerekkel elérhető volt az állatok állapotának javítása a  $K_v1.3$  csatornák gátlása révén.



### 2.1.5 A $K_v$ csatornákat gátló peptid skorpió toxinok

A terápiában orálisan alkalmazható gyógyszermolekulák általában megfelelnek a Lipinski féle „ötös” szabálynak, mely körülírja az ideális gyógyszermolekula tulajdonságait a móltömegre, lipofilitásra, és hidrogén-kötés kialakítási potenciálra vonatkozóan (144). Ezek meghatározzák az emberi testben a gyógyszermolekula farmakokinetikáját, ide értve a felszívódását, testbeli eloszlását, metabolizmusát és kiválasztását. E kritériumok alapján az ideális molekula kis molekulatömegű és enyhén lipofil tulajdonságú. A fent említett kísérletek többségében e kritériumoknak egyáltalán nem megfelelő peptid toxinokat alkalmaztak a kóros immunfolyamatok gátlására. Bár ezeket a toxinmolekulákat nem orálisan adagolták, a kísérletek eredményessége azt mutatja, hogy a peptid-alapú gyógyszermolekuláknak lehet létjogosultsága.

Az elmúlt években számos peptid toxint izoláltak különböző állatok, így skorpiók mérgeiből, melyek ioncsatornák, köztük a feszültség-függő  $K^+$  csatornák nagy affinitású gátlószereinek bizonyultak (145). A skorpiók mérge vegyületek gazdag keverékét tartalmazza, köztük számos peptid-komponenst, melyek igen széles molekulatömeg-spektrumot fednek le. Az ioncsatornákon biológiai aktivitást mutató összetevők gyakran kisméretű peptid toxinok, melyek modulálhatják  $Na^+$ ,  $Cl^-$  vagy rianodin-szenzitív  $Ca^{2+}$  csatornák működését, de a legnagyobb és legjobban tanulmányozott csoport a  $K^+$  csatornákat gátló toxinokat tartalmazza (KTx) (146).

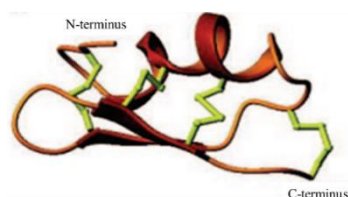
A  $K^+$  csatornákhöz specifikusan kötődő peptid toxinok két szempontból bizonyultak igen értékesnek:

1. Nagyon hatékony molekuláris eszközként használhatók a csatornák szerkezetének és működésének vizsgálata során (147, 148). Annak vizsgálata, hogy a toxinban és / vagy a csatornában létrehozott mutációk hogyan módosítják a köztük kialakuló kölcsönhatást rendkívüli flexibilitást tesz lehetővé e kísérletekben (149-151). Ismert szerkezetű toxinokkal végzett dokkolási szimulációkkal lehetőség nyílik közeli rokonságban levő csatornák közötti minimális szerkezeti különbségek felderítésére, melyek magyarázhatják a köztük megfigyelt funkcióbeli különbségeket. A  $K^+$  csatornák egy adott altípusát specifikus toxinnal gátolva elkülöníthető egy adott sejtben a hasonló  $K^+$  csatornák funkciója.

2. Figyelembe véve a  $K^+$  csatornák fiziológiás és patológias szerepének rendkívül széles spektrumát és testbeli eloszlásuk sejt- és szövet-specifitását, az utóbbi években vonzó

farmakológiai célponttá váltak különböző betegségek terápiájában (152). A fentebb említett állatmodell kísérletek bizonyítják az ilyen irányú kutatások megalapozottságát.

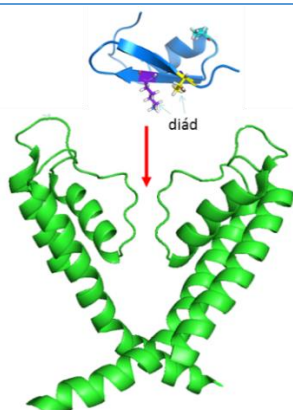
A  $K^+$  csatornákat gátló skorpió toxinok között megtalálhatók rövid (23-42 aminosav) és hosszú (43-84 aminosav) láncú peptidek, melyek szerkezetét három vagy négy diszulfid híd stabilizálja. Jelenleg a KTx toxinokat négy családra -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  és  $\kappa$  - osztjuk szerkezeti hasonlóságuk és a  $K^+$  csatornák iránti specificitásuk alapján (145). A  $\kappa$ -KTx-ek kivételével a másik három család összes tagjára jellemző a Cisztein-stabilizált  $\alpha/\beta$  szerkezeti motívum (CS- $\alpha\beta$ ), melyben az  $\alpha$ -hélix egy  $\beta$ -lemezhez csatlakozik, és a struktúrát két diszulfid híd rögzíti  $C_i$ - $C_j$  and  $C_{i+4}$ - $C_{j+2}$  konfigurációban (12. ábra). Bár a CS- $\alpha\beta$  topológia domináns szerkezeti jellemző a KTx-ek között, nem csak e molekulacsoport sajátja, hiszen más funkciójú peptidek között is felfedezhető ez a motívum (153-155). Kizárólag e szerkezeti elem megléte alapján tehát nem egyértelmű a toxin  $K^+$  csatorna gátló képessége.



**12. ábra Az  $\alpha$ -KTx családba tartozó toxinok jellegzetes szerkezete.**

Az anurotoxin ( $\alpha$ -KTx 6.12) szerkezete mutatja a családra jellemző szerkezeti elemeket: négy diszulfid híd (sárga) stabilizálja a struktúrát, található benne egy rövid  $\alpha$ -hélix, és két anti-parallel  $\beta$ -lemez.

A peptid-csatorna interakció során a toxinok a csatorna extracelluláris régiójához kötődve eltömítik annak pórusát, amit az ismert pórus blokkoló tetraetil-ammóniummal végzett kompetíciós kísérletek bizonyítanak (156). A bekötődött toxin így megakadályozza a csatornán keresztüli ionáramlást (13. ábra). A KTx-ek többsége tartalmaz két, általában egymástól 9 pozíciónyira elhelyezkedő, „esszenciális diádnak” nevezett, párt alkotó aminosavat, mely diád meghatározó jelentőségű az affinitás és szelektivitás szempontjából (157). Ezek egyike egy („centrális”) lizin, melynek pozitív töltésű oldallánca benyúlik a csatorna negatív szelektivitási szűrőjébe a gátlás során, a másik pedig egy hidrofób, jellemzően aromás aminosav, számos toxinban egy tirozin. A diád aminosavak a toxin  $\beta$ -lemez oldalán találhatóak, ez a felszín kerül közeli kapcsolatba a csatorna pórus extracelluláris régiójával. A diádon kívül egyéb aminosavak is részt vesznek a kontaktus kialakításában, s ezáltal hozzájárulnak a szelektivitás meghatározásához.

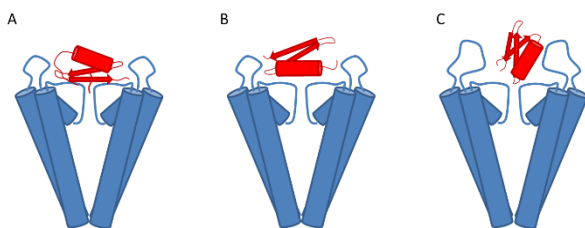


### 13. ábra Az $\alpha$ -KTx toxinok jellegzetes blokkolási mechanizmusa.

A toxin a csatorna pórusának extracelluláris végébe kötődve dugóként zárja el az ionáramlás útját. A kötődés fontos eleme a diád lizin pozitív oldalláncának benyúlása a szelektivitási szűrőbe, valamint a másik diád aminosav kölcsönhatása a csatorna pórushoz közeli aminosavaival.

E tipikus gátlási orientáción kívül leírtak még két, ritkábban előforduló elrendezést is (14. ábra). A KCa<sub>2.x</sub> csatornákhöz az  $\alpha$ -KTx4.2 és az  $\alpha$ -KTx5 alcsoad néhány tagja a tipikus orientációhoz képest „háttal” fordulva kötődik, azaz a  $\beta$ -lemezhez képest az ellentétes oldalon levő  $\alpha$ -hélix alakítja ki a fő interakciós felszínt (158, 159). A  $\gamma$ -KTx család tagjai pedig, melyekből hiányzik a pórusba benyúló kritikus lizin, a hERG (K<sub>v</sub>11.1) csatornákhöz az azok szokásosnál magasabb torony régiójához kötődnek, távolabb a pórus bejáratától (160). Ahogy az ErgTx példája mutatja, az ilyen módon kötődő toxin nem képes a pórus komplett elzárására, és ezáltal nem is hoz létre teljes áram gátlást (161).

### 14. ábra Az KTx toxinok ismert gátlási orientációi



(A) Az  $\alpha$ -KTx-ek tipikus gátlási orientációja. (B) A KCa<sub>2.2</sub> (SK) csatorna gátlása során az  $\alpha$ -KTx5.3 fordított orientációval, az  $\alpha$ -helikális régiójával hat kölcsön a csatornával. (C) Az  $\alpha$ -KTx2.1 a hERG csatorna pórus szájadékától távolabb, a toronyrégióhoz kötődik, és nem is okozza az ionáram teljes gátlását.

Farmakológiai szempontból a peptid toxinok egyáltalán nem felelnek a Lipinski kritériumoknak, ugyanis lényegesen nagyobb (~ 4 kDa) és polárosabb molekulák az ideális gyógyszermolekulánál (< 500-800 Da), sőt, jellemzően többszörös nettó töltéssel is rendelkeznek és számos hidrogén-kötés kialakítására alkalmasak. Ezek alapján a terápiás célú orális adagolásuk jelenleg egyszerűen nem kivitelezhető. Ugyanakkor a keringésbe kerülve már bizonyos tulajdonságaik előnyt jelentenek a kis molekulájú hidrofób vegyületekkel szemben. A nagyobb interakciós felületük lényegesen erősebb kölcsönhatás kialakítását teszi lehetővé a csatornafehérjével, így a peptid toxinok jellemzően 2-3 nagyságrenddel alacsonyabb félhatásos koncentrációval képesek a célcsoportot gátolni, mint a kis molekulájú szerek. A nagyobb és

komplexebb szerkezetű kontakt-felület a kapcsolat specifikusságát is növeli, mely gyógyszermolekulák esetén egy rendkívül fontos elvárás.

A feszültség-kapuzott káliumcsatornák, különösen az azonos családba tartozók, nagyfokú szekvencia-homológiával rendelkeznek, ezért előfordul, hogy a pórus extra- és intracelluláris végénél található „gátlószereceptor” régiók csak minimális szerkezeti különbségeket mutatnak. Ilyen esetekben az alacsony szelektivitású gátlószerek több különböző ioncsatornát is blokkolhatnak, eltérő affinitással. Mivel a szervezet különböző szöveteiben, legfőképp az ingerelhető sejtekben a feszültség-függő  $K^+$  csatornák szerepe kulcsfontosságú a sejtek működéséhez, a nem szelektív gátlószerek terápiás alkalmazása akár súlyos mellékhatásokkal is járhat (162, 163).

*In vitro* és *in vivo* kísérletek is kimutatták a Kv1.3 gátlószerek hatékonyságát és potenciális terápiás alkalmazhatóságát (2, 141, 142). Mivel valóban szelektív, nagy affinitású természetes gátlószerek ritkán izolálhatók, irányított mutációk révén lehetséges javítani a toxinok farmakológiai tulajdonságait. A megfelelő mutációk tervezéséhez elengedhetetlen a toxin-csatorna interakció minél részletesebb ismerete, melyhez az újonnan izolált skorpiótoxinok szerkezetének meghatározása és farmakológiai karakterizálása is segítséget nyújthat.

#### 2.1.6 Motiváció a Kv csatornák kapuzási mechanizmusának és a csatorna-toxin kölcsönhatás részleteinek megismeréséhez

A fentiek alapján látható, hogy a szervezet legkülönbözőbb sejtjeiben valamint tumor sejtekben előforduló Kv csatornák a sejtek alapvető funkcióit, és így szövetek vagy akár szervek tulajdonságait képesek befolyásolni. Kritikus tehát megérteni a kapuzás történéseit molekuláris szinten, és azt, hogy ezen a szinten hogyan hat kölcsön a csatornafehérje az olyan környezeti tényezőkkel, melyek e történéseket módosíthatják. Ilyen tényezők például a tumorok környezetében, vagy gyulladásos területeken a fiziológias értékektől jelentősen eltérő lokális ionkoncentrációk és pH.

A terápiás alkalmazással kecsegtető peptid toxinok csatornákkal kialakított kölcsönhatásának részleteit ismerve lehetőség nyílik a kölcsönhatást a kívánt irányba módosítani például az affinitás vagy a szelektivitás javításának érdekében. Ilyen irányú kutatási eredményeink hozzájárulhatnak a peptid toxinok jövőbeni terápiás célú felhasználásának

elősegítéséhez, illetve az újabb nagy affinitású és szelektív Kv1.3 gátlók tervezésének sikerességéhez.

## 2.2 A feszültség-függő $\text{Na}^+$ ioncsatornák kapuzása

### 2.2.1 A nátrium ioncsatornák áttekintése

Bár  $\text{Na}^+$  ionokat sok különböző családba tartozó ioncsatorna képes átengedni, a nagy  $\text{K}^+$ -szelektivitású ioncsatornák magas számához képest igen kevés olyan csatorna ismert, mely nagy  $\text{Na}^+$ -szelektivitással bír. Ingerelhető sejtekben az akciós potenciálok kiváltásában szerepet játszó ligand-kapuzott neurotransmitter receptor csatornák, mint például a nikotinos acetilkolin-receptor (nAChR) vagy az N-metil-D-aszpartát receptor (NMDAR), nem-szelektív kationcsatornák, melyek alegység-összetételük függvényében a  $\text{Na}^+$  mellett jellemzően  $\text{K}^+$  és / vagy  $\text{Ca}^{2+}$  ionokra is permeábilisak, így nem tekinthetők  $\text{Na}^+$  csatornáknak. Hasonlóképpen  $\text{Na}^+$ -permeábilisak, de nem szelektívek az érzékszervek jelátvitelében is szerepet játszó ciklikus nukleotidok által kapuzott (CNG) csatornák, és az endo-lizoszómális rendszerben expresszálandó két-pórusú (TPC) csatornák sem (8, 164). A központi idegrendszerben széles körben kifejeződő „szivárgó”  $\text{Na}^+$  csatorna (sodium leak channel), az  $\text{Nav}_1.2.1$ , szerkezeti rokonságban áll a feszültség-függő  $\text{Na}^+$  csatornákkal, de azoktól eltérően feszültség-független (165). Feltételezhető, hogy a sok neuronban megfigyelhető tetrodotoxin-rezisztens, feszültség-független szivárgási  $\text{Na}^+$  áramért ez a csatorna a felelős (166). Elnevezésével ellentétben azonban e csatorna szelektivitása is igen alacsony más kationokkal szemben. Az alábbiakban a nagyobb  $\text{Na}^+$ -szelektivitású ioncsatornákat mutatom be.

#### Epiteliális $\text{Na}^+$ csatorna (ENaC)

Az ENaC csatorna három homológ alegységből felépülő  $\text{Na}^+$ -szelektív csatorna, mely a polarizált epiteliális sejtek apikális membránjában található elsősorban a vesében, tüdőben és vastagbélben. Fő funkciója a  $\text{Na}^+$  reabszorpciója a vesében, ezáltal kritikus szerepe van a szervezet só és víz homeosztázisában, de szerepe van a sós íz érzékelésében is az íz-receptor sejtekben. Négy gén kódolja az  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  és  $\delta$  alegységeket, melyek közül egy  $\alpha$  vagy  $\delta$  áll össze egy-egy  $\beta$  és  $\gamma$  alegységgel a funkcionális trimer kialakításához (167, 168). A csatorna

konstitutívan nyitott állapotban van, az expresszió mértékét, s ezen keresztül az ionfluxust a keringésben levő aldoszteron-mediált transzkripció szabályozza.

Sav-érzékeny (proton-kapuzott) csatornák (Acid-sensing ion channels = ASICs)

Az ASIC csatornák a  $\text{Na}^+$  csatorna szupercsalád tagjai, és így rokonságban állnak az ENaC csatornákkal. Egy ASIC alegység két transzmembrán doménből áll, és a csatorna homo- vagy heterotrimerként funkcionál, mint proton-kapuzott, feszültség-független  $\text{Na}^+$  konduktancia (169, 170). Négy ASIC alegység ismert, melyek több splice variánssal is rendelkeznek, de ezek nem mindegyike képes önállóan működő csatornát kialakítani, hanem csak módosítják másik alegységek működését. Az ASIC csatornák széles körben kifejeződnek a szervezetben, részt vesznek például az ízérzékelésben, de fő funkciójuk központi és perifériás neuronokban, köztük a fájdalomérzékelő neuronokban, a sav-érzékenység megvalósítása (168).

Az  $\text{Na}_x$  csatorna

Az  $\text{Na}_x$  csatorna az agy specifikus részeiben fejeződik ki neuronokban és gliasejtekben. Alapvető szerkezete megegyezik az  $\text{Nav}$  és  $\text{Cav}$  csatornák 4 x 6 TM szerkezetű, folytonos, négy doménből álló felépítésével, de azokkal csak alacsony homológiát mutat. A csatorna  $\text{Na}^+$ -szenzorként működik, és így kulcsszerepe van a szervezet só és folyadék homeosztázisában (171, 172).

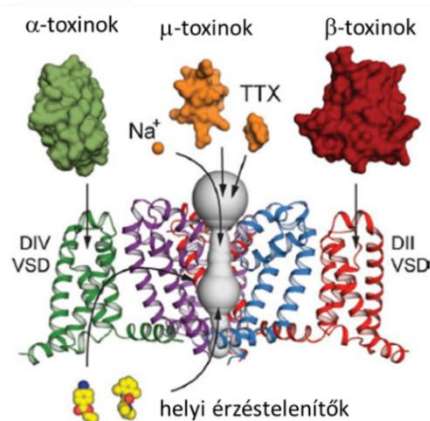
Feszültség-függő  $\text{Na}^+$  csatornák ( $\text{Nav}$ )

Ez a legkorábban azonosított, és legjobban tanulmányozott  $\text{Na}^+$ -szelektív ioncsatorna család, mely kilenc tagjának közismert funkciója az akciós potenciál felszálló szárának kialakítása. Szinte minden ingerelhető sejt membránjában megtalálhatók e csatornák, melyeket az egyesített nomenklatúra alapján  $\text{Nav}1.1$ - $1.9$ -nek nevezünk (173, 174). Az  $\text{Nav}1.1$ - $1.3$  és  $1.6$  csatornák elsősorban a központi idegrendszer neuronjaiban fejeződnek ki, de megtalálhatók perifériás neuronokban is, míg a  $\text{Nav}1.7$ - $1.9$  csatornák szinte kizárólag a perifériás idegrendszer neuronjaiban expresszálódnak. Az  $\text{Nav}1.4$  a vázizom, az  $\text{Nav}1.5$  pedig a szívizom feszültség-függő  $\text{Na}^+$  csatornája. Az  $\text{Nav}$  csatornák jól ismert gátlószere a gömbhalban is megtalálható tetrodotoxin (TTX), mely erős neurotoxin, ami már  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$  testsúly kg koncentrációban is halált okozhat (175, 176). Az  $\text{Nav}$  csatornákat a TTX által okozott gátlás félhatásos koncentrációja



alapján ( $IC_{50}$ ) TTX-érzékeny és TTX-rezisztens csatornákra oszthatjuk. Az  $Nav1.1$ - $1.4$  és  $1.6$ - $1.7$  csatornák TTX-érzékenyek  $IC_{50} = 1$ - $25$  nM tartományban, míg az  $Nav1.5$ ,  $1.8$  és  $1.9$  a rezisztens csatornák, melyeket a TTX csak  $\mu$ M-os koncentráció-tartományban gátol (8). Jellemzően TTX érzékenység alapján csak e két fő kategória egyikébe sorolható be egy ismeretlen identitású Nav csatorna, mivel a megállapított  $IC_{50}$  érték függ az alkalmazott mérési módszertől, az expressziós rendszertől és a fajtól, amiből a csatorna származik, ezért jelentős szórás és így átfedések figyelhetők meg az egyes csatornatípusok között, ami megakadályozza az egyértelmű azonosítást. Ugyanez igaz a kinetikai paraméterekre is, hiszen hasonlóan gyorsan, néhány tized ms alatt aktiválódnak és a lényegesen lassabb  $Nav1.8$  és  $Nav1.9$  kivételével ugyanúgy  $0,5$ - $1$  ms-os időállandóval inaktiválódnak. A nyitási valószínűség feszültség-függését leíró Boltzmann-függvény jellemző paramétere a  $V_{1/2}$ , az a membránpotenciál érték melynél a csatornák fele nyit ki, illetve a  $k$  érték, mely a függvény meredekségét jellemzi (magasabb érték „lankásabb”, kevésbé meredek feszültség-függést jelez). Ezen egyensúlyi paraméterek szintén nagy szórást mutatnak a fent említett körülményektől függően, ráadásul a később említendő kiegészítő  $\beta$  alegységek jelentős mértékben módosíthatják e kinetikai és egyensúlyi paramétereket. Ezen okok miatt natív sejtekben az Nav csatornák azonosítása a biofizikai paraméterek meghatározásán túl legtöbbször szükségessé teszi molekuláris biológiai módszerek alkalmazását is.

A TTX mellett számos, Nav csatornák működését módosító peptid toxin is ismert, melyek a csatorna különböző strukturális elemeihez kötődhetnek (15. ábra), és a Kv csatorna-gátló skorpiótoxinokkal ellentétben az egyszerű pórusblokkon túl a kapuzást is erősen módosíthatják (177, 178). Igen fontos, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott gátlószer csoportot jelentek a helyi érzéstelenítők, melyek legismertebb képviselője a lidokain. E vegyületek a Nav csatornák gátlásán keresztül gátolják az akciós potenciál kialakulását, és így az idegi vezetést (179).

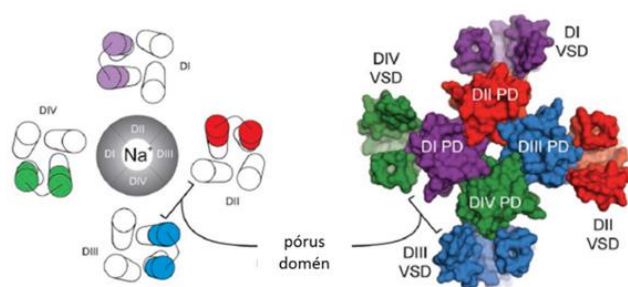


### 15. ábra Az Nav csatornák gátlószereinek támadáspontjai.

Az  $\alpha$ -skorpió toxinok a DIV doménhez kötődve lassítják az inaktivációt, a  $\mu$ -conotoxinok a TTX-hez hasonlóan a pórusba kötődve gátolják az ionáramlást, míg a skorpió és pók  $\beta$ -toxinok a DII doménhez kötődnek, és az aktiváció feszültség-függését módosítják. A helyi érzéstelenítők, mint a lidokain, az intracelluláris oldalról, vagy a membránon keresztül kötődnek a pórus belsejébe és gátolják a  $Na^+$  ionok áramlását.

### 2.2.2 A feszültség-függő $\text{Na}^+$ csatornák szerkezeti sajátosságai és kapuzása

A funkcionális  $\text{Na}_v$  csatornák egyetlen pórusformáló  $\alpha$ -alegységből állnak, melyhez egy vagy több  $\beta$ -alegység csatlakozhat (180). Az  $\alpha$ -alegység négy homológ, hat transzmembrán hélixet tartalmazó doménből áll (DI-DIV), melyek a  $\text{K}_v$  csatornák egy-egy alegységeinek felelnek meg (16. ábra). Ezen domének működése azonban messze nem olyan szimmetrikus, mint egy homotetramer  $\text{K}_v$  csatorna alegységei esetén, egyedi funkcióik vannak a kapuzási lépések során (178). A csatornák szelektivitási szűrőjét a  $\text{K}_v$  csatornákhöz hasonlóan a négy domén S5 és S6 szegmensei közötti pórushurkok együttesen alakítják ki, mindegyik domén egy-egy aminosav oldallánccal hozzájárulva a DEKA szekvenciájú szűrőhöz. A pórus további részét az S6 szegmensek határolják, és ezek alakítják ki a pórus intracelluláris oldalán az aktivációs kaput (181).

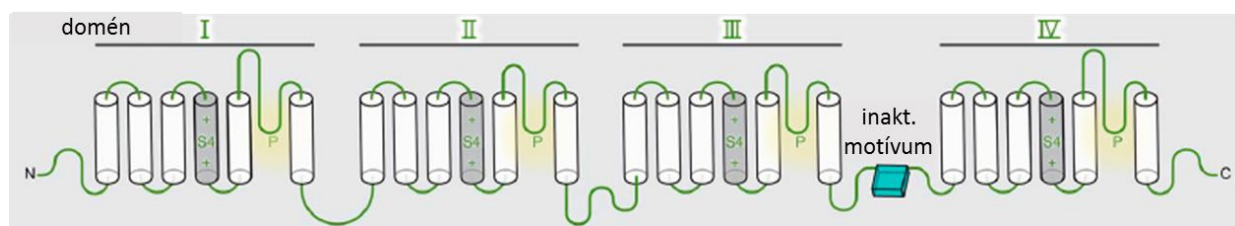


**16. ábra Az  $\text{Na}_v$  csatornák domén szerkezete.**

Az  $\text{Na}_v$  csatornák szerkezete nagyon hasonló a  $\text{K}_v$  csatornáéhoz, de azoktól eltérően egyetlen folytonos polipeptid lánc alkot egy funkcionális csatornát. A négy domén (DI-DIV) mindegyike tartalmaz egy VSD és egy PD régiót. Megfigyelhető a  $\text{K}_v$  csatornák többségére jellemző domén-felcserélt elrendezés, azaz az egy doménhez tartozó VSD-k és PD-k nem egymás mellett helyezkednek el.

Az  $\text{Na}_v$  csatornákra jellemző az aktivációt rövid időn belül követő gyors inaktiváció, mely szorosan kontrollálja a sejtbe áramló  $\text{Na}^+$  ionok mennyiségét. A gyors inaktivációt egy, a III-as és IV-es domént összekötő intracelluláris hurkon elhelyezkedő, három aminosavból álló IFM-motívum hozza létre a pórus intracelluláris oldalához bekötődve és elzárva az ionáramlás útját (17. ábra).

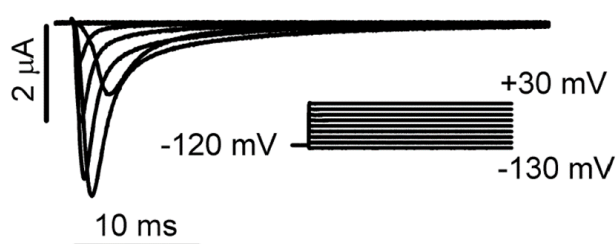
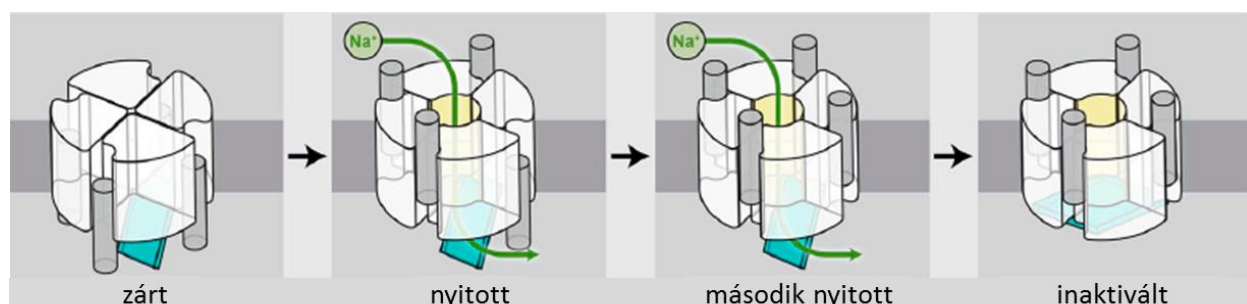




**17. ábra Az  $Na_v$  csatornák transzmembrán topológiája.**

Az egyes domének hat transzmembrán hélixet tartalmaznak. A DIII-DIV összekötő tartalmazza az IFM inaktivációs motívumot, amely a nyitást követően elzárja a pórust az intracelluláris vége felől, gátolva az ionáramlást.

Depolarizáció során a DI-DIII feszültségszenzorok elmozdulása kinyitja a csatorna pórusát, majd a lassabb kinetikájú DIV elmozdulása olyan konformáció-változást eredményez a pórus belső vége körül, hogy kialakul egy „második nyitott állapot” (18. ábra), s ezzel a nagy affinitású kötőhely az IFM-motívum számára (182). Ingerelhető sejtekben a gyors inaktiváció következtében alakul ki az abszolút refrakter periódus, mely alatt nem képződhet újabb akciós potenciál a  $Na^+$  beáramlás hiánya miatt.



**18. ábra Az  $Na_v$  csatornák kapuzása.**

(Fent) A modell szerint depolarizáció során a DI-DIII domének VSD-je aktiválódik, melynek hatására nyílik a csatorna. A DIV-VSD késéssel aktiválódik, ezután a pórus intracelluláris vége képes kötni az inaktivációs IFM-motívumot, ami elzárja az ionáramlás útját. (Balra) Reprezentatív áramgörbék  $Na_v1.5$  csatornákról. Az egyre növekvő depolarizációs impulzusokkal kiváltott áramokon látható az aktiváció feszültség-függő gyorsulása, majd a gyorsan végbemenő inaktiváció.

Az inaktiváció során kialakul a korábban említett, és a  $K_v$  csatornáknál is megfigyelhető, kapuzási töltés immobilizáció, ami az inaktivációs IFM-motívum és a VSD-k között fellépő kölcsönhatás okoz. Patkány izom  $Nav$  csatornán azt találták, hogy a repolarizáció során lassan visszatérő töltés a DIII- és DIV-VSD-k IFM által akadályoztatott visszatéréséből származik, míg a gyorsan visszatérő hányad a DI- és DII-VSD-k töltését jelenti (183). Ezzel szemben humán  $Nav1.5$  csatornákon csak a DIII-VSD szerepét mutatták ki az inaktiváció által okozott lassú töltés visszatérésben, míg a DIV-VSD visszatérését attól függetlennek találták (184). Az irodalmi adatok alapján tehát az inaktivációs mechanizmusok kölcsönhatása a feszültség-érzékelő doménekkel a feszültség-függő ioncsatornák általános tulajdonságának tekinthető, de a kölcsönhatás részletei csatornánként változhatnak, így egyedi kapuzási modellek lehetnek szükségesek még azonos családba tartozó csatornák esetén is.

### 2.2.3 $Nav1.5$ , a szív feszültség-függő $Na^+$ csatornája

A szív kamrai és pitvari akciós potenciáljait jelentős, depolarizációt okozó  $Na^+$  beáramlás indítja el a feszültség-függő  $Nav1.5$  csatornákon keresztül (185). Az  $Nav1.5$   $\alpha$ -alegységét az *SCN5A* gén kódolja, és felépítése megfelel a fent ismertetett általános  $Nav$  struktúrának. A csatorna a TTX-rezisztens csoportba tartozik, amiért a pórusban található C373 aminosav felelős, ugyanis a C373Y mutáció TTX-érzékennyé változtatja a csatornát (186). A depolarizáció hatására kialakuló áramcsúcsot követő kis amplitúdójú, de hosszabban aktív „késői”  $Nav1.5$  áram szintén jelentős szabályozója az akciós potenciál hosszának. Az akciós potenciál kialakításában betöltött központi szerepe miatt az olyan molekuláris szintű kölcsönhatások, melyek interferálnak az  $Nav1.5$  működésével, könnyen vezethetnek aritmiák kialakulásához. Az  $Nav1.5$  mutációi 3-as típusú hosszú QT szindrómát (LQT3), Brugada-szindrómát, Sick Sinus szindrómát és pitvari fibrillációt okozhatnak (187, 188). Sok esetben a mutációk az inaktiváció folyamatát befolyásolják: LQT3 betegekben a csökkent inaktiváció funkció-nyeréses változást okoz, azaz fokozódik a  $Na^+$  beáramlás és ezzel megnyúlik az akciós potenciál, míg Brugada-szindróma esetén gyakran a felgyorsult inaktiváció okoz funkció-vesztés miatt csökkent  $Na^+$  beáramlást és vezet aritmiához.

### 2.2.4 Motiváció a hNav1.5 csatorna kapuzásának molekuláris szintű megértéséhez

Az I-es típusú antiaritmiás szerek (pl. lidokain vagy flekainid) az Nav1.5 csatornán keresztül hatnak, és hatásmechanizmusuktól függően különböző típusú aritmiák kezelésére alkalmasak (189). E csatorna kapuzásának molekuláris szintű ismerte kritikus a potenciálisan életet is veszélyeztető betegségek kialakulásának megértéséhez, valamint a célzott terápiában alkalmazható gátlók hatásmechanizmusának finomhangolásához.

## 2.3 A Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) technika meghonosítása

A feszültség-függő ioncsatornák egyszerű molekuláris kapcsolóként működnek a membránpotenciál változásának függvényében, de ezt a funkciót számos faktor módosíthatja. Ennek a „finom szabályozásnak” a megismeréséhez a klasszikus biofizikai módszereket (pl. patch-clamp, két elektródás voltage-clamp) ki kell egészíteni olyan funkcionális szerkezetvizsgáló módszerekkel, melyek segítségével valós időben követhetők a szerkezeti átalakulások, felderíthető a funkcionális domének közötti kommunikáció. Így lehetőség nyílik olyan fundamentális események megértésére, mint a feszültség-szenzor átrendeződése és a csatornák aktivációs/inaktivációs kapui közötti kommunikáció vagy a lassú inaktivációból történő visszatérés molekuláris történései. Ez utóbbiak pedig a celluláris neurobiológiai rendszerek és neuronhálózatok finomhangolása szempontjából olyan fontos jelenségeket befolyásolnak, mint az akciós potenciálok alakjának és a  $\text{Ca}^{2+}$  jeleknek a változása repetitív akciós potenciál tüzelés során.

Amerikai tanulmányutam során elsajátítottam a feszültség-zár fluorometria (Voltage-Clamp Fluorometry = VCF) technikát, mely éppen ilyen jellegű többlet információt szolgáltat. A VCF egy hatékony elektrofiziológiai módszer, melyet a világon csak néhány tucat, itthon pedig – tudomásunk szerint – rajtunk kívül egyetlen laboratórium sem alkalmaz. E módszer előnye, hogy egyidejűleg vizsgálható az ioncsatornákon átfolyó áram hagyományos két-elektrodás feszültségzárral mérve, valamint a feszültség-kapuzott csatornák feszültség-szenzorához vagy a pórusformáló részhez kapcsolt fluoreszcens festék jelével e domének mozgása (190). Ezáltal információt nyerünk ugyanazon csatorna-populáció pórusának és feszültség-szenzorának kapuzási állapotáról, követhető e domének kapuzási kinetikája, és

következtetéseket lehet levonni a két domén közötti csatolásról (részletesebb leírás az Anyagok és Módszerek fejezetben). Amerikai kutatómunkám során a szív feszültség-függő Nav1.5 Na<sup>+</sup> csatornájával kapott eredményeim kiválóan érzékeltetik e módszer potenciálját a VSD-k és az aktivációs kapu közötti kommunikáció vizsgálatában.

Mivel munkacsoportunk egy másik tagja is a VCF technika segítségével vizsgált egy új feszültség-érzékeny fehérjét egy amerikai laboratóriumban, és e munkáját ő is folytatni kívánta hazatérése után, célunk volt létrehozni egy VCF mérőállomást a hozzá tartozó infrastruktúrával együtt, hogy eszköztárunkat bővítsük, és kutatásainkat új irányokba fordíthassuk.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ, illetve célokat tűztem ki a feszültség-függő ioncsatornák kapuzásával és a  $K_v$  csatornák skorpió toxinokkal való kölcsönhatásával kapcsolatban:

#### 3.1 A $K_v$ csatornák kapuzásának és az azt moduláló faktoroknak a vizsgálata

##### 3.1.1 A VSD és a pórus domén közötti csatolás és kationok hatása a csatolásra

Depolarizáció során a feszültség-szenzor elmozdulása megelőzi a pórus nyitását, de a hiperpolarizáció hatására végbemenő visszatérési lépések sorrendje nem teljesen tisztázott. Vizsgálni kívántuk, hogy milyen összefüggés van a feszültség-szenzor domén mozgása és a pórus záródása között a csatorna hiperpolarizáció alatt létrejövő deaktivációja során, és hogyan módosítják ezt különböző permeabilitású kationok. Célunk volt továbbá annak tisztázása, hogy a hosszan tartó depolarizáció hatására kialakuló C-típusú inaktiváció hogyan módosítja a VSD és az aktivációs kapu közötti csatolást.

##### 3.1.2 Az intra- és extracelluláris pH hatása a $K_v$ csatorna kapuzásra

Az irodalomból ismert volt különböző  $K_v$  csatornák kapuzásának pH függése, melyre alapozva célunk volt szisztematikusan megvizsgálni, hogyan módosítja a  $K_v$  csatornák kapuzását, illetve a csatornán átfolyó áramot az intra- és extracelluláris pH csökkentése. Széles pH-tartományban kívántuk vizsgálni a kapuzásra gyakorolt hatást, és célunk volt a változások molekuláris alapjának felderítése.

##### 3.1.3 A $K_v1.3$ inaktivációjának anomális pH-függése

A T-limfociták aktivációjában kulcsszerepet játszó  $K_v1.3$  csatornáról ismert volt, hogy a pH csökkentésére a csatorna inaktivációjának kinetikája a többi vizsgált  $K_v$  csatornával ellentétes módon változik. Célunk volt e megfigyelésnek a hátterében álló molekuláris mechanizmus meghatározása, és a jelenséget leíró modell felállítása.

## 3.2 $K_v$ csatornákat gátló skorpió toxinok vizsgálata

### 3.2.1 Új $K_v1.3$ -gátló skorpió toxinok azonosítása és karakterizálása

A T-sejtekben domináns  $K_v1.3$  csatorna terápiás potenciáljának ismeretében célunk volt új, skorpió mérgekből izolált,  $K_v1.3$  csatornát gátló peptid toxinok felkutatása. Izolálást követően vizsgálni kívántuk a toxinok szekvenciáját, szerkezetét, valamint elvégezni biofizikai és farmakológiai karakterizálásukat.

### 3.2.2 Az anuroctoxin $K_v1.3$ iránti szelektivitásának javítása

Az anuroctoxin egy, korábban munkacsoportunk által azonosított természetes  $K_v1.3$ -gátló toxin, mely azonban alacsony szelektivitással bír. Célunk volt a toxin szintetikus előállítása és  $K_v1.3$  iránti szelektivitásának javítása célzott pontmutációkkal. Tisztázni kívántuk továbbá, hogy a mutáns toxin szerkezetében a mutációk által létrehozott szerkezeti változások hogyan befolyásolják a csatornával történő kölcsönhatást.

## 3.3 A szívizom $Na_v1.5$ csatorna kapuzásának vizsgálata

### 3.3.1 Az egyes VSD-k aktivitásának vizsgálata a kapuzás során.

A  $Na_v$  csatornák szerkezetüknél fogva jóval aszimmetrikusabban működnek a  $K_v$  csatornáknál, az egyes VS domének egyedi feszültség-függéssel és kinetikával mozognak a kapuzás során, ami jól követhető a VCF technikával. Bár már születtek VCF mérések a patkány izom  $Na_v1.4$  csatornáról, egyéb irodalmi adatok arra utaltak, hogy jelentős eltérések lehetnek a humán szívizom  $Na_v1.5$  kapuzásában ahhoz képest. Ezért célunk volt a  $hNa_v1.5$  esetén kideríteni, hogyan aktiválódnak és deaktiválódnak az egyes VSD-k a kapuzás során, illetve, hogy két, Brugada-szindrómát okozó mutáció esetén milyen változások történnek ezekben a kapuzási lépésekben.

### 3.3.2 Az $Na_v1.5$ inaktivációját leíró modell tökéletesítése

A fiziológiás szív működésben, illetve a potenciálisan fatális aritmiák kialakulásában kritikus elem az  $Na_v1.5$  csatorna inaktivációja, illetve az abból való visszatérése, mivel ezek meghatározó folyamatai a szív akciós potenciál formálásának. A DIV-VSD szerepe az inaktiváció kialakulásában ismert volt, és bizonyos korábbi eredmények utaltak a DIII-VSD

lehetséges szerepére is, azonban ezek egymáshoz viszonyított szerepe, illetve kapcsolata az IFM inaktivációs motívummal nem volt világos. Ezen felül ellentmondás volt a különböző Nav1.x csatornákkal és különböző fajokból származó eredmények között. Ezért célunk volt konkrétan a humán Nav1.5 csatorna inaktivációja, különösen a szív akciós potenciál hosszával összemérhető időtartam, során kialakuló kapuzási lépések feltárása, és ez alapján egy koherens inaktivációs modell felállítása.

### **3.4 A Feszültség-zár Fluorometria (VCF) technika meghonosítása és alkalmazása**

Külföldi tanulmányutam során lehetőségem nyílt elsajátítani a VCF technikát, mely lehetővé teszi a feszültség-függő ioncsatornák funkcionális doménjeinek független nyomon követését, s ezáltal a kapuzás mechanizmusának mélyebb megértését. Célom volt e hazánkban eddig nem alkalmazott technika meghonosítása, és a csatorna kapuzás vizsgálatára történő alkalmazása.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Sejtek és ioncsatorna expressziós vektorok

#### 4.1.1 Humán limfociták

A skorpió toxinok hatását hKv1.3 csatornán, a csatornát expresszáló, egészséges donorokból vett humán perifériás T-limfocitákon is mértük, melyeket Ficoll-Hypaque sűrűség grádiens centrifugálással izoláltuk. A sejteket kétszer mostuk 25 mM HEPES-t is tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  mentes Hanks' oldattal (pH: 7,4), majd  $0,5 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban 2-7 napig tenyésztettük 5%  $\text{CO}_2$  mellett  $37^\circ\text{C}$ -on 24 lyukú tenyésztőedényekben, RPMI-1640 médiumot használva, mely tartalmazott 10% FBS-t, 100 IU/l penicillint, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycint és 2 mM L-glutamint. A sejteket 2,5, 5 illetve 10 mg/ml phytohemagglutinnal (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) aktiváltuk majd a Kv1.3 áramokat az aktivációt követő 2-7. napban mértük.

#### 4.1.2 Sejtvonalak

##### tsA201 sejtvonal

A tsA201, azaz az SV40 large T antigénnel transzformált humán embrionális vese sejteket (HEK) magas glükóz (4500 mg/ml), 10% FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/ml penicilin-G, és 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin tartalmú Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) tápoldatban tenyésztettük,  $37^\circ\text{C}$ -on, 5%  $\text{CO}_2$  és 95%-os páratartalom mellett. A sejteket hetente háromszor passzáltuk.

A tsA201 sejtekben az alábbi ioncsatorna kódoló géneket expresszáltuk Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagenssel történő transzfekciót követően:

A hKv1.1, hKv1.2, hKv1.6 és hKv1.7 géneket pCMV6-GFP vektorban expresszáltuk, melyeket az Origene cégtől rendeltük.

A hKv1.3 csatornát a korábbiakban p-EGFP-C1 vektorba klónoztuk (Dr. Hajdú P.).

A hKv1.4 IR (inaktivációs domain-től megfosztott) gént kódoló vektort D. Fedida, (University of British Columbia, Vancouver, Canada) ajándékozta.

A hKv1.5 gént kódoló plazmidot Dr. Heike Wulff (University of California, Davis CA) biztosította számunkra.

A rKv2.1 gént kódoló vektort Dr. S. Korn, (University of Connecticut, Storrs, CT) biztosította számunkra.



A hKCa3.1 (IKCa1) gént a pEGFP-C1 vektorban expresszáltuk, melyet szintén Dr. Heike Wulff ajándékozta.

A Shaker IR (inaktivációs doméntól megfosztott) csatorna expressziós vektorát G. Yellen (Harvard Medical School, Boston, MA) ajándékozta.

A hNaV1.5 csatorna expressziós vektorát R. Horn (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) ajándékozta.

A hERG csatorna génjét SH. Heinemann (Max-Plank-Gesellschaft, Jena, Germany) biztosította.

A hKCa1.1 (BK) gént pCneo plazmidban T. Hoshi (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) ajándékozta.

Mivel a HEK sejteken több ioncsatorna természetes, endogén expresszióját is leírták, a sejteken minden esetben outside-out patch konfigurációban végeztük az elektrofiziológiai méréseket.

#### L929 sejt vonal

Egér kötőszöveti eredetű sejt vonal. Az egér Kv1.1 (mKv1.1) csatorna génjével stabilan transzfektált L929 sejt vonalat [37] H. Wulff (UC Davis, CA, USA) ajándékozta munkacsoportunknak. A sejteket a tsA201 sejteknél leírtak szerint tenyésztettük, ahol a tápoldatot 300 µg/ml geneticinnel (G418) egészítettük ki a stabil transzfektáns sejtek pozitív szelekciója miatt.

#### CTLL-2 sejt vonal

Egér citotoxikus T sejt vonal. A sejteket 10% FBS-sel (Hyclone, Logan, UT), 2 mM Na-piruváttal, 10 mM HEPES-sel, 4 mM L-glutaminnal, 50 µM 2-mercaptoetanollal, és 100 CU/ml IL-2-vel kiegészített RPMI-1640 tápoldatban tenyésztettük.

#### CHO sejt vonal

A kínai hörcsög petefészkéből izolált sejt vonal sejtjeit a tsA201 sejtekkel megegyező körülmények között tenyésztettük. A CHO sejtekben a hKv1.1 és hKv1.2 csatornákat expresszáltuk.

### Sf9 sejtvonala

Az Sf9, rovar eredetű sejtvonalon végzett méréseket kollaborációs partnereink (Prof. Lourival Domingos Possani munkacsoportja, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Mexikó) végezték. A sejtekbe Shaker-IR ioncsatornát expresszáltak bakulovírusos transzfekciót követően.

#### 4.1.3 Tranziens transzfekció

A sejteket (CHO és tsA201) Lipofectamine 2000 reagenst használva transzfektáltuk a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) útmutatásai szerint, standard feltételek között tenyésztve. A transzfektlást 35 mm átmérőjű szövettenyésztő Petri csészében végeztük a sejtek kb. 80%-os konfluenciája mellett. A hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.5, hKv1.6 és IKCa1 csatornákat kódoló vektorok C-terminális GFP (zöld fluoreszcens fehérje) tag-gel látják el a csatornákat, így a transzfektált, csatornát expresszáló sejtek fluoreszcens mikroszkóp segítségével közel 100%-os pontossággal azonosíthatók. A hKv1.4, rKv2.1, Shaker-IR, hERG, Nav1.5 és BK csatornák esetében a csatornát expresszáló gént 10:1 arányban kotranszfektáltuk a GFP génjét kódoló plazmival, így a zöld fluoreszcenciát mutató sejtek nagy valószínűséggel a csatorna génjét kódoló vektort is felvették, és kifejezésre juttatják. A GFP pozitív, transzfektált sejteket Nikon TE2000U vagy TS100 invert fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

#### 4.1.4 *Xenopus laevis* oociták előkészítése és injektálása

A nőstény békákból eltávolított oocitákat  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldatban kezeltük kollagenázzal, hogy a folliculáris réteget eltávolítsuk [38], majd egészséges V. stádiumú sejteket válogattunk ki. A hazai VCF mérésekhez a kiválogatott oocitákat az Ecocyte Bioscience-től (Castrop-Rauxel, Németország) rendeltük. Drummond nanoinjektálóval (Drummond Scientific Co.) 30-50 nl kívánt koncentrációjú, a vizsgálni kívánt csatornát kódoló RNS-t injektáltunk a sejtekbe. Az Nav1.5 csatornák vizsgálatához együttesen injektáltuk a  $\beta 1$  (UniProtKB/Swiss-Prot accession no. Q07699.1) és az  $\alpha$ -alegységeket (accession no. Q14524.1) kódoló RNS-t 2:1 moláris arányban (sejtenként összesen 50 ng RNS) az oocitákba. Ezt követően a sejteket a mérések előtt 1-7 napig inkubáltuk 18°C-on, ND-96 oldatban (mM-ban: 96 NaCl, 2 KCl, 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 5 HEPES, 2.5 Na-piruvát, és 1% penicillin-streptomycin, pH 7.4). Patch-clamp

mérések előtt a sejteket 5-10 percre hiperozmotikus oldatba helyezve a zsugorodást követően csipeszekkel eltávolítottuk a vitellin membránt.

## 4.2 Molekuláris biológia

### 4.2.1 A Kv1.3 csatorna mutációi

A vad-típusú és a H399Y mutánst tartalmazó pRc/CMV plazmidot, és a humán CD4 –et kódoló Ccd4neo plazmidot Dr. Carol Deutsch-től kaptuk ajándékba (University of Pennsylvania Philadelphia, PA). A többi mutáns csatornát a QuikChange kittel hoztuk létre (Stratagene, La Jolla CA).

### 4.2.2 Az Nav1.5 csatorna mutációi és mRNS szintézis

Minden mutációt átfedéssel extenziós (2 primer páros) PCR-rel végeztünk Phusion Hot Start Flex Kit (New England Biolabs) felhasználásával, a primereket Sigma-Aldrich-től rendeltük. A PCR termékeket T4 DNA ligázzal (New England Biolabs) helyeztük a plazmidokba (pBSTA a  $\beta 1$  alegységhez, pMAX az  $\alpha$  alegységhez), melyeket Turbo kompetens sejtekbe transzformáltunk (New England Biolabs). Több klón kiválasztása után a plazmidokat NucleoSpin Plasmid miniprep kittel (Macherey-Nagel) izoláltuk. A minták szekvenálását követően egyetlen klont választottunk ki Midiprep készítéséhez (NucleoBond Xtra Midi, Macherey-Nagel). Minden konstruktot linearizáltunk és futtatás után NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kittel tisztítottuk (Macherey-Nagel). Az oociták injektálásához az mRNS-t mMessage mMachine T7 Transcription Kittel szintetizáltuk (Life Technologies) és fenol-kloroformos extrakcióval tisztítottuk.

## 4.3 Toxinok

### 4.3.1 Natív és rekombináns toxinok

A toxinokat skorpió mérgekből izolálták mexikói kollaborációs partnereink. A faj több élő egyedét befogták, majd megfelelő laboratóriumi körülmények közt tartva az állatok mérget többszöri, elektromos stimulációval kinyerték. Az összegyűjtött méregből a vízdékony

komponenseket kioldották, majd ebből a toxint HPLC technikával, C18 fordított fázisú oszloppal tisztították.

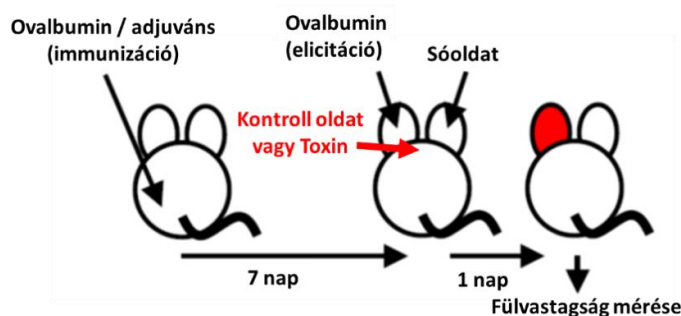
A rekombináns margatoxint (rMgTx) az Alomone Labs-tól (Izrael, Jeruzsálem), a szintetikus margatoxint (sMgTx) a Peptide Institute Inc.-től (Japán, Osaka) vásároltuk

#### 4.3.2 Anuroctoxin előállítása kémiai szintézissel

A vad típusú anuroctoxint (sAnTx WT), illetve annak mutáns változatait (sAnTx N17A, sAnTx F32T, sAnTx N17A/F32T) a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetben, Prof. Tóth Gábor és munkatársai állították elő Fmoc/tBu stratégiával TentaGel R PHB, illetve Wang hordozón CEM mikrohullámú peptid szintetizátoron. A ciklizált termékeket szemipreparatív HPLC-n tisztították, analitikai jellemzésüket retenciós idejük és molekulatömegük mérésével végezték.

#### 4.4 In vivo DTH reakciók

Minden állatkísérletet jóváhagyott a Baylor College of Medicine állathasználattal és tartással foglalkozó bizottsága. A nőstény Lewis patkányokat rats (9–10 hetesek) a Harlan cégtől (Indianapolis, IN) vásároltuk és patogénmentes környezetben tartottuk, tápszer és víz a rendelkezésükre állt *ad libitum*. Az aktív DTH-t a korábbiakban leírtak szerint váltottuk ki (191), a patkányokat komplett Freund adjuvánsban (Sigma-Aldrich) emulgeált ovalbuminnal immunizálva. Az elicitáció 7 nappal később történt ovalbuminnal (20  $\mu$ g / 20  $\mu$ l oldatban) az egyik fülcimpában (kezelt fül). A másik fül csak hordozó oldatot kapott (kontroll fül). A patkányok egyetlen szubkután injekcióban kaptak vagy csak hordozó oldatot (PBS + 2 % patkány szérum) vagy 0,1 mg/kg Vm24-et 0,5 ml hordozó oldatban a nyak hátuljába az elicitációval egyidőben (19. ábra).



#### 19. ábra Az aktív DTH-reakció kiváltása

A patkányokat ovalbuminnal / adjuvánsal immunizáltuk, az elicitáció 7 nap múlva történt ovalbuminnal az egyik fülben. A kezelt állatok ekkor kaptak toxint is szubkután injekcióban. Egy nap múlva történt a fül vastagságának mérése.

Az adoptív DTH-t a korábban leírtak szerint váltottuk ki (191), in vitro aktivált Ova-GFP T limfociták intraperitoneális injektálásával ( $5 \times 10^6$  sejt / patkány, a sejteket Dr. Flügel ajándékozta, University of Göttingen, Göttingen, Germany) 1 ml hordozó oldatban. Az elicitáció 2 nappal később történt a fülben, amikor a patkányok hordozó oldatot vagy Vm24-et is kaptak a fent leírtak szerint. Mindkét reakció analízisekor a fülvastagságot az elicitáció után 24 órával mértük egy rugós mikrométerrel (Mitutoyo, Aurora, IL) három tizedes jegy pontossággal. Ugyanazon a helyen végzett hat mérés átlagát számoltuk ki, és használtuk a statisztikai analízis során. A specifikus fül duzzadást (változás a fül vastagságában) az adott állat ovalbuminnal kezelt és PBS-sel kezelt füleinek vastagságában mért különbségeként határoztuk meg, és ezt hasonlítottuk össze a Vm24-gyel kezelt illetve nem kezelt kontroll állatokban.

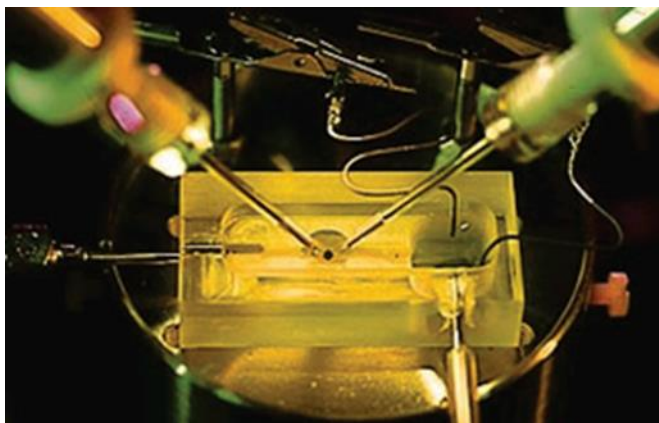
#### 4.5 Az alkalmazott elektrofiziológiai technikák általános áttekintése

Az ioncsatornák legalapvetőbb tulajdonsága, hogy áramot vezetnek a membránon keresztül. Az elektrofiziológiai mérések célja a csatornán átfolyó áram mérése alapján következtetni a csatorna tulajdonságaira. Az árammérés kivitelezéséhez szükséges a membránpotenciál egy adott értéken történő stabilizálása, melyet „Voltage Clamp” (VC), azaz feszültség-zár technikának neveznek. A feszültség-zár alapötletét Kenneth Cole-nak és George Marmont-nak tulajdonítják, akik 1947-ben alkalmazták e technikát tintahal óriás axonon, de az ötvenes évek elején Hodgkin és Huxley tették nevezetessé az akciós potenciál ionáramokon alapuló részletes leírásán keresztül (6).

A feszültség-zár technika lényege, hogy egy „feszültség-elektrodával” mérjük a transzmembrán potenciált a földhöz (extracelluláris oldal) képest, és egy „áram-elektrodával” áramot jutattunk a sejtbe. A feszültség-zár elektronika egy negatív visszacsatolású kört alkalmaz a beállított tartófeszültség stabilizálására. Az erősítő méri a kívánt tartófeszültség és a feszültség-elektrodával ténylegesen detektált membránpotenciál különbségét, és ezen „hibajel” alapján a különbség megszüntetéséhez szükséges áramot injektál a sejtbe az áram-elektrodán keresztül.

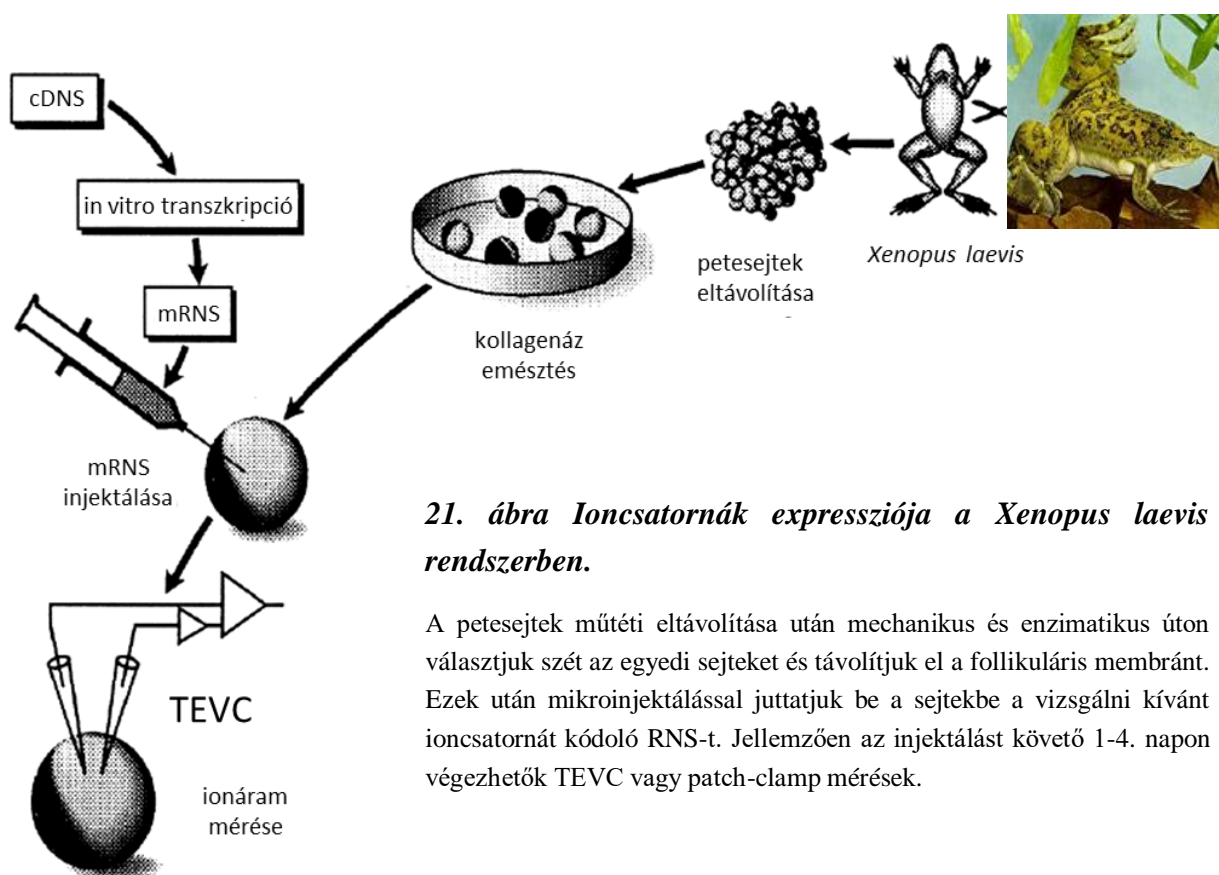
#### 4.5.1 A két-elektrodás feszültség-zár technika (TEVC)

A mikroelektrodák elterjedése óta a technikát jellemzően *Xenopus laevis*, azaz afrikai karmosbéka, petéin alkalmazzák két-elektrodás feszültség-zár (Two-Electrode Voltage Clamp = TEVC) néven (192). Ekkor a két elektrodát jelentő vezetéket egy-egy elektrolittal töltött, kis ellenállású üveg mikropipettába vezetjük, melyeket a sejtbe szúrva kerülnek az intracelluláris oldallal elektromos kontaktusba az elektrodák (20. ábra). A *Xenopus* oociták nagyon hatékonyan képesek kifejezni exogén ioncsatornákat, melyek génjét RNS formában mikroinjektálással juttatják a sejtbe (21. ábra). E sejtek kellően nagy méretűek ahhoz, hogy a pipettákat a sejtmembrán durva sérülése nélkül beléjük lehessen szúrni, s így a membránpotenciál tartásához szükséges, az áram-elektrodán mért áram megegyezik a membrán ioncsatornáin keresztül átfolyó árammal. A sejt nagy mérete lehetővé teszi több tíz vagy akár száz  $\mu\text{A}$  amplitúdójú áramok mérését is, ugyanakkor „space-clamp” problémát vet fel, ami azt jelenti, hogy az áram-elektroda pontforrás jellegéből adódóan nem minden esetben képes térben és időben megfelelően homogén membránpotenciált biztosítani a sejtmembrán teljes felületén. További hátránya e technikának, hogy az intracelluláris oldat összetétele nem változtatható, valamint nem is ismert pontosan.



**20. ábra Kételektrodás feszültség-zár (TEVC) mérés *Xenopus* oocitán.**

A petesejt egy perfundálható mérőkamrában helyezkedik el, ami lehetővé teszi az oldatcserét, membránját egy feszültség-mérő és egy áram-injektáló elektródával szúrjuk át, így állíthatjuk be a kívánt membránpotenciált, és mérhetjük az ioncsatornákon átfolyó áramot.



**21. ábra Ioncsatornák expressziója a *Xenopus laevis* rendszerben.**

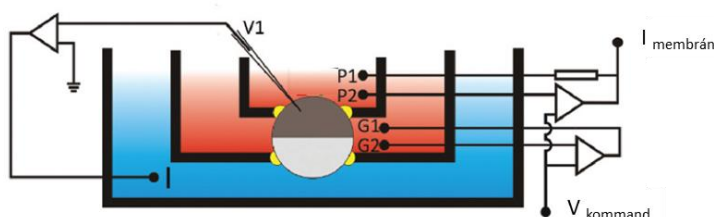
A petesejtek műtéti eltávolítása után mechanikus és enzimatis úton választjuk szét az egyedi sejteket és távolítjuk el a follikuláris membránt. Ezek után mikroinjektálással juttatjuk be a sejtekbe a vizsgálni kívánt ioncsatornát kódoló RNS-t. Jellemzően az injektálást követő 1-4. napon végezhetők TEVC vagy patch-clamp mérések.

#### 4.5.2 A Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika (COVG)

A TEVC technika egy bonyolultabb, de több szempontból előnyösebb változata a Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika (COVG) (193). Ennek során az oocita membránját térben három elszigetelt részre osztjuk (itt alkalmazható a vazelin a szigetelés javítása érdekében), és az ioncsatornák aktivitását csak a felső „sapkából” mérjük, mely a teljes membránfelület 1/10-1/6-od része (22. ábra). A sejt alsó részét jellemzően szaponinnal permeabilizáljuk, és az alsó, intracelluláris oldat potenciálját állítjuk földpotenciálra. A felső, extracelluláris oldat potenciálját változtatjuk az intracelluláris nullához képest, melynek értékét egy, a felső sapkába szúrt pipettával ellenőrizzük. A középső rész a két szélső tartomány még hatékonyabb elszigetelését hivatott megvalósítani. Mivel egy kisebb membrándarab feszültségét kontrolláljuk, és az intra- és extracelluláris oldatok potenciálját kis ellenállású agarhidakkal állítjuk be, mind a soros ellenállással, mind a membránkapacitással kapcsolatos problémák minimalizálódnak, csakúgy, mint a „space clamp” problémák. Ezáltal a beállított



membránpotenciál jóval gyorsabban elérhető, mint TEVC esetén, és a passzív kapacitív áramtűskék is kisebbek, könnyebben kompenzálhatók lesznek. Ezek az előnyök lehetővé teszik olyan gyors kinetikájú áramok mérését, mint például a feszültség-függő  $\text{Na}^+$  csatornák árama, vagy kapuzási áramok (194).



## 22. ábra A Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika (COVG).

Az oocita membránját három szegmensre osztjuk, az ionáramokat a felső „sapkából” mérjük. Az egyes kamrák nyílásainál alkalmazható a vazelin (sárga) a kompartmentek jobb elszigetelése érdekében. Az alsó részt permeabilizáljuk, és áram injektálásával földpotenciálra tartjuk, míg a felső oldatot állítjuk a parancs potenciál negatívjára. Így alakult ki a kívánt feszültség a felső membrán darabon keresztül, melyet az elektródával ellenőrizünk.

### 4.5.3 A kapuzási áram és kapuzási töltés mérése

A  $\text{Kv}$  csatornák kapuzásáról értékes információt szolgáltat a membránpotenciál megváltoztatásának hatására a főleg az S4 szegmensben levő töltések elmozdulásából származó kapuzási áram, illetve ennek idő szerinti integrálja, a kapuzási töltés (195). A kapuzási áram amplitúdója jellemzően 2-3 nagyságrenddel kisebb a csatornán átfolyó ionáram amplitúdójánál, ezért méréséhez olyan speciális körülmények szükségesek, melyek során az ionáram szinte teljes mértékben hiányzik a mérés során. Ez elérhető például hatékony gátlószer nagy koncentrációjú alkalmazásával, ionáramot nem vezető mutáns csatornákkal, vagy a permeáló ion igen alacsony koncentrációja mellett az egyensúlyi potenciálra történő depolarizációval. A permeáló ion teljes elhagyása ugyanis gyakran a csatornát egy funkcióképtelen konformációs állapotba juttatja.

A kapuzási áram kinetikája informál a VSD konformáció-változásának sebességéről, több komponens jelenléte például utalhat arra, hogy az elmozdulás több fázisban történik meg. A kapuzási áramok idő szerinti integrálja az elmozdult töltés nagyságát adja meg (pontosabban az elmozdult töltés és az elektromos mező átszelt hányadának szorzatát), amiből a csatornák számának ismeretében kiszámolható az egy csatornára jutó kapuzási töltés. Ez az érték a *Shaker*

csatorna esetén mintegy 13  $e_0$  nagyságú, ami magyarázza a csatorna meredek feszültség-függését (196).

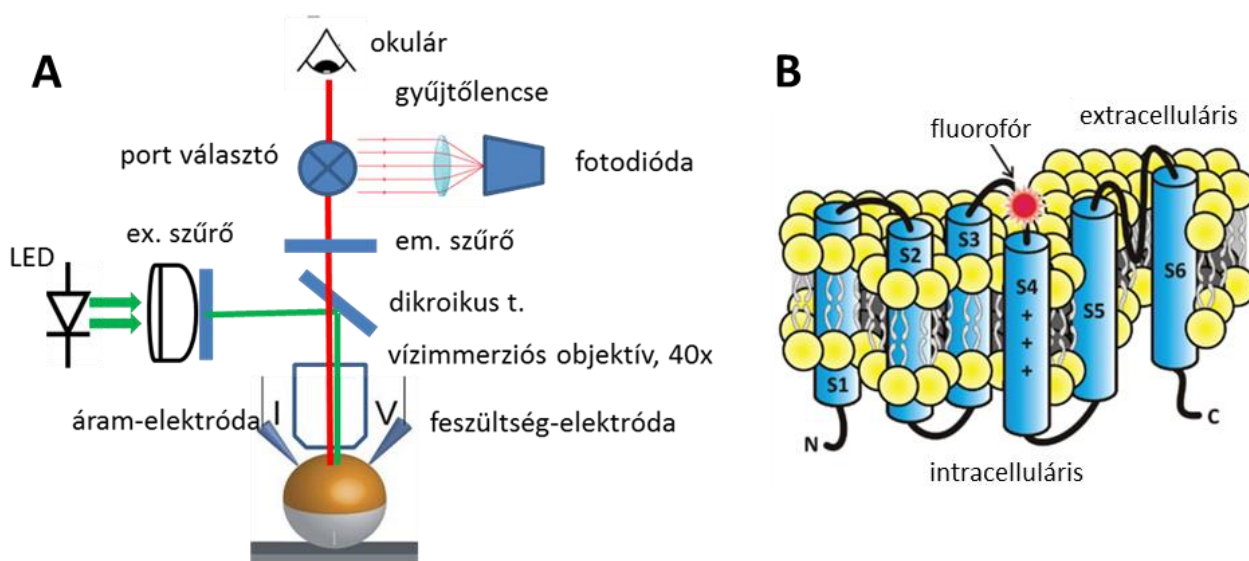
Különböző tesztfeszültségek mellett meghatározva és ábrázolva az elmozdult töltés nagyságát megkapjuk a Q-V görbét, ami jellemzően egy kétállapotú rendszert leíró Boltzmann-függvénnyel illeszthető. Ez a VSD-k elmozdulásának feszültségfüggését jellemzi, de globálisan az egész csatornára nézve, így az egyes VSD-k mozgása nem különíthető el. Ez  $K_v$  csatornáknál nem jelent problémát, mivel a négy alegység egyenértékű és azonos mozgást végez. Az egy folytonos polipeptid láncból álló feszültség-függő  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$  csatornáknál azonban a négy domén (melyek megfelelnek a  $K_v$  csatornák egy-egy alegységének) különböző funkciókat lát el a kapuzás során, és emiatt eltérő kinetikával és feszültség-függéssel működnek, így ezeknél a kapuzási áramok értelmezése nehezebb.

#### 4.5.4 Feszültség-zár fluorometria (Voltage-clamp Fluorometry = VCF)

A feszültség-zár fluorometria egy hatékony elektrofiziológiai módszer feszültség-függő ioncsatornák vizsgálatára, melyet először 1996-ban az Isacoff laboratórium alkalmazott (190). E módszer előnye, hogy egyidejűleg vizsgálható az ioncsatornákon átfolyó áram hagyományos két-elektrodás feszültségzárral mérve, valamint a feszültség-kapuzott csatornák feszültség-szenzorához vagy a pórusformáló részhez kapcsolt fluoreszcens festék jelével e domének mozgása. Ezáltal információt nyerünk ugyanazon csatorna-populáció pórusának és feszültség-szenzorának kapuzási állapotáról, követhető e domének kapuzási kinetikája, és következtetéseket lehet levonni a két domén közötti csatolásról.

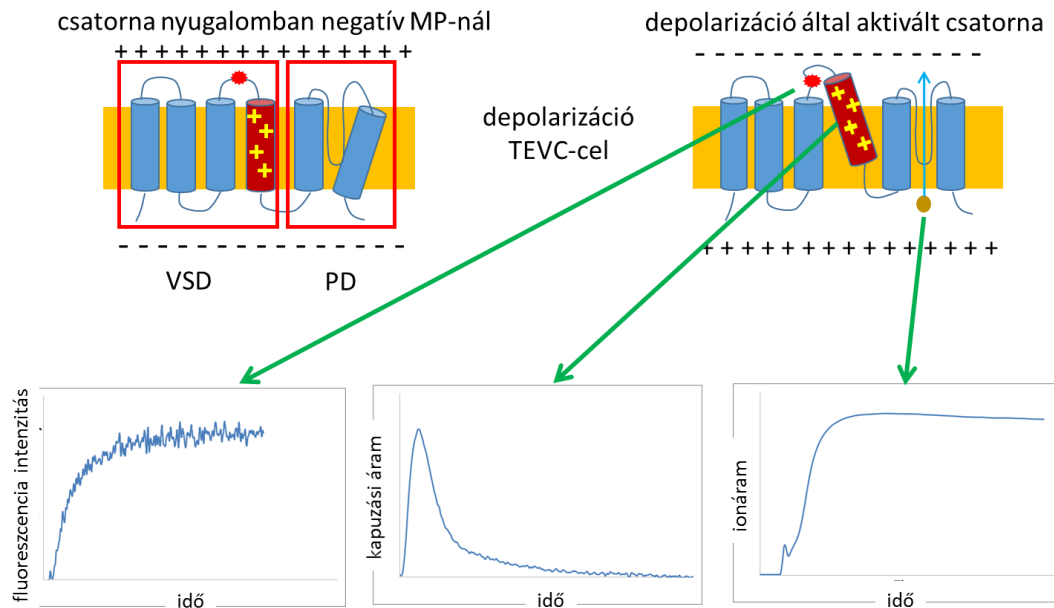
A technika lényege, hogy a csatorna szekvenciájában egy célzott pozícióban egy aminosavat ciszteinre mutálunk, melyhez aztán jelölés során a cisztein tiol-csoportjával reagáló és fluoreszcens festékkel konjugált molekula kapcsolódik. A fluoreszcens jelölt leggyakrabban maleimidhez vagy metántioszulfonáthoz kapcsolják. Az optimális jelölési pozíció jellemzően a VSD régióban van, ott is a feltételezhetően legnagyobb mértékű mozgást kivitelező S4 hélix közelében. Tipikusan az extracelluláris S3-S4 közötti hurokban található, esetenként akár több, jelölésre alkalmas pozíció (103). Az ide kötődött fluoreszcens jelölő a feszültség-függő kapuzás során az S4 által indukált konformáció-változás miatt megváltozott fiziko-kémiai környezetbe kerül (dielektromos állandó változása, fluoreszcencia kioltásra képes aminosavak közelsége, stb.), ami módosítja az emisszió intenzitását (23-25. ábrák). Az intenzitás változása lehet

növekedő vagy csökkenő, sőt akár több komponensű attól függően, hogy a festék molekula milyen mozgást végez a kapuzás során. Hasonlóképpen, egymás közelében levő pozíciókból származó jelek mutathatnak igen eltérő amplitúdókat vagy polaritást. Fontos tehát megjegyezni, hogy a jel változása nem feltétlenül a festékmolekula mozgását mutatja, hanem a környezetének változását, ami származhat a fehérje egyéb részeinek a festékhez történő közeledéséből vagy távolodásából. Nagy előnye viszont e technikának a kapuzási áramok méréséhez képest, hogy az egyes domének mozgása egyedileg vizsgálható  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák esetén.



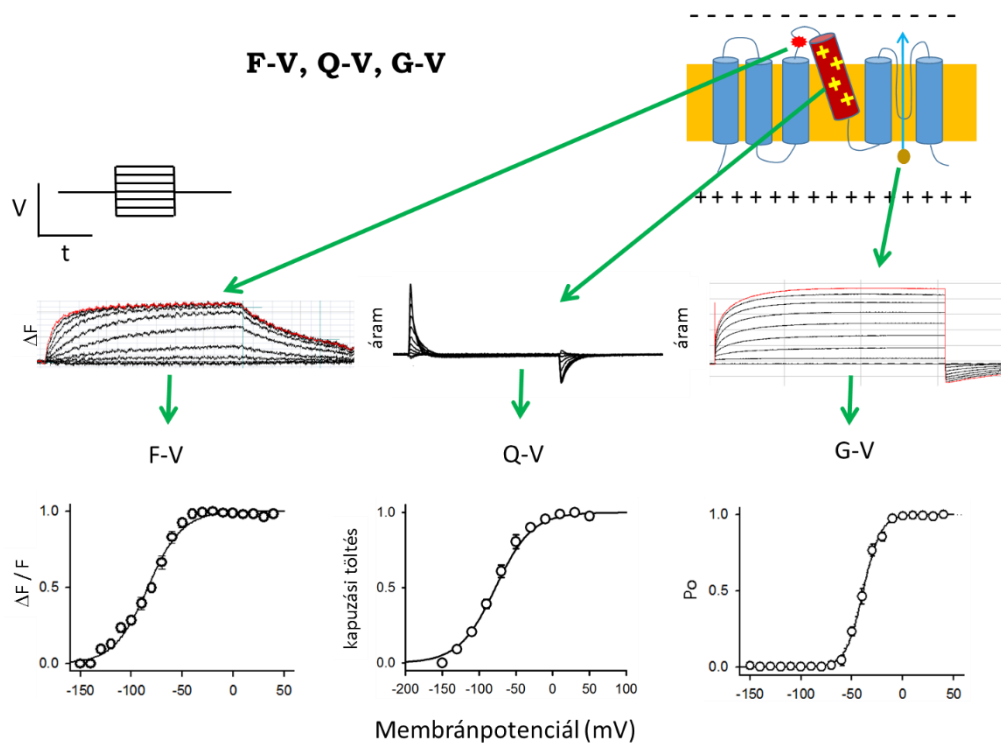
### 23. ábra A feszültség-zár fluorometria (VCF) technikai megvalósítása.

(A) A technika épülhet két-elektrodás (TEVC, mint az ábrán) vagy **COVG** elrendezésre, mellyel a membránpotenciált kontrolláljuk, és az ionáramot mérjük. A vizsgált sejt felső membrándarabjáról vízimmersziós objektívvel gyűjtjük be a fluoreszcenciás jelet, melyet fotodiódával mérünk. (B) A fluoreszcenciás jelet tiol-reaktív vegyületekhez kapcsolt fluorofórok szolgáltatják, melyek a feszültség-függő csatorna S3-S4 összekötőjébe helyezett ciszteinhez kötődnek, és a VSD mozgása során a környezet megváltozása miatt változik a fluoreszcencia intenzitása.



**24. ábra A VCF technikával nyerhető információ.**

A depolarizációra elmozduló VSD-hez kapcsolt fluorofór intenzitása megváltozik az új környezetben, ez adja a fluoreszcenciás jelet. Az elmozduló S4 szegmens kapuzási töltései hozzák létre a kapuzási áramot, ami ionáram hiányában (pl. permeáló ionok hiányában) mérhető, jellemzően COVG technikával a jobb feszültség-kontroll és kisebb zaj miatt. A depolarizáció hatására kinyíló csatornákon átfolyó ionáram TEVC vagy COVG technikákkal mérhető.



**25. ábra Feszültség-függő paraméterek kinyerése VCF technikával.**

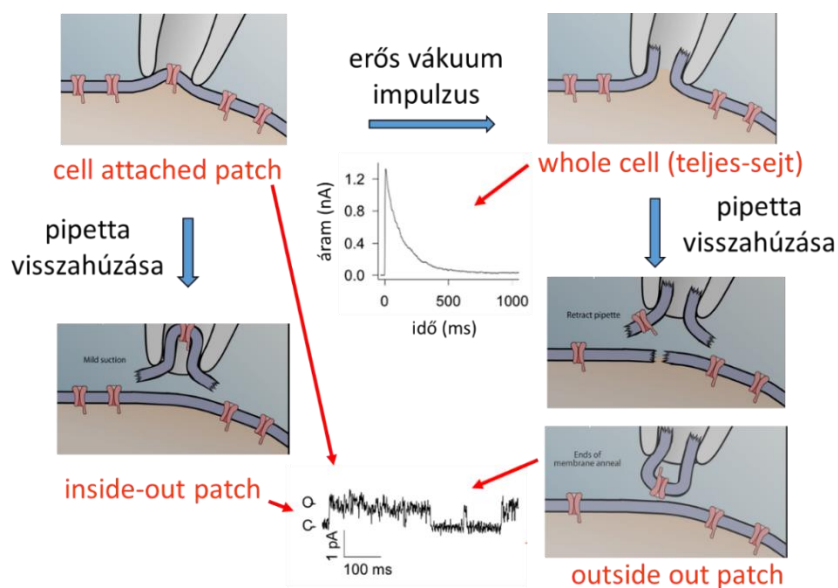
Egy tartófeszültségről különböző tesztfeszültségekre depolarizálva a sejtet, a mért jelekből megkonstruálható a fluoreszcencia változás (F-V), a kapuzási töltés (Q-V), és a konduktancia (G-V) feszültség-függése, illetve meghatározhatók aktivációs, deaktivációs és inaktivációs kinetikai paraméterek.

#### 4.5.5 A patch-clamp technika

Kisméretű sejteken az ioncsatornák aktivitása a patch-clamp módszerrel követhető nyomon, melyet Hamill, Marty, Neher, Sakmann és Sigworth fejlesztett ki az 1980-as évek elején (197). Itt a sejtek mérete kisebb nyílású, azaz nagyobb ellenállású pipetta használatát követeli meg, mely egyedül tölti be a feszültség-mérő és az áram-injektáló elektróda szerepét. A földpotenciált jelentő elektróda itt a sejtet körülvevő extracelluláris oldatba merül. Minden patch-clamp kísérlet az üvegpipetta és a sejtmembrán között létrejövő nagy ellenállású kontaktus (giga-seal) kialakításával kezdődik. Ennek eredménye az ún. sejthez-kapcsolt vagy cell-attached-patch konfiguráció. Ilyenkor a sejt membránja és a citoplazma összetétele ép marad, így a csatornák működése közel fiziológiás körülmények között vizsgálható. Ezt követően több különböző mérési konfiguráció alakítható ki a mérés céljától függően. Ha ebből az állapotból a pipettát eltávolítjuk a sejttől, egy kis membrándarab kiszakad úgy, hogy annak a korábban a citoplazma felé eső oldala az extracelluláris oldat felé fog nézni (inside-out konfiguráció). Így hozzáférhetővé válik a csatornák intracelluláris oldala és vizsgálható az intracelluláris oldat összetételének vagy intracellulárisan kötődő ligandok, gátlók hatása.

A giga-seal kialakulása után a pipettán keresztül szívást alkalmazva kiszakítható a pipetta nyílása alatti membrándarabka, s így hozzáférhetővé válik a sejt belseje. Ez az ún. teljes-sejt, vagy whole-cell konfiguráció. Ilyenkor az egész sejtmembránon átfolyó áram mérhető, és jól tanulmányozható például az aktiváció feszültségfüggése vagy az inaktivációs kinetika. Az extracelluláris oldat cseréjével vizsgálható különböző gátlók hatása és a csatornák farmakológiai tulajdonságai.

Ebből a konfigurációból a pipetta eltávolításával kiszakítható egy membrándarabka, mely újra összetapadva hozza létre az outside-out konfigurációt, vagyis a membrán extracelluláris oldala továbbra is az extracelluláris oldattal érintkezik, de a teljes membránnak csak kis részét tartalmazza, ezáltal lényegesen kevesebb csatornát is (26. ábra). Ekkor a teljes-sejt konfigurációhoz hasonló mérések végezhetők, de a kisebb felszín és térfogat miatt gyorsabb és homogénebb membránpotenciál-kontroll mellett. Alacsony csatornasűrűség esetén inside-out és outside-out konfigurációkban egyedi csatorna mérések is végezhetők, mellyel további információk, például az egyedi vezetőképesség is meghatározhatók.



**26. ábra** A *patch-clamp* technika mérési konfigurációi.

Gyenge vákuum alkalmazásával először kialakul a „giga-seal” sejthez kapcsolt (cell-attached) módban. Innen a pipetta elhúzásával téphető ki egy membrándarab, elérve az „inside-out” konfigurációt. A sejthez kapcsolt módban egy erős vákuum impulzussal „belyukadhatunk” a sejtbe, kialakítva a teljes-sejt konfigurációt. Ebből lassan visszahúzással a pipettát alakul ki az outside-out konfiguráció.

## 4.6 Az elektrofiziológiai mérésekhez használt műszerek és oldatok

### 4.6.1 Feszültség-zár fluorometriás mérések (Voltage-clamp Fluorometry = VCF) TEVC technikával

Az oocitákon az áramméréseket egy Warner TEV-700 két-elektrodás feszültség-zár munkaállomáson végeztük (OC-725 erősítővel). A fluoreszcencia méréséhez az oocitákat 10  $\mu\text{M}$  metánszulfonát-karboxitetrametilrodaminnal (MTS-TAMRA) vagy Alexa488-maleimiddel jelöltük (Santa Cruz Biotechnology) depolarizáló oldatban (mM: 110 KCl, 1,5  $\text{MgCl}_2$ , 0,8  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 EDTA and 10 HEPES, pH 7.1) jégen 20 percig. A megvilágítást 470 nm és 530 nm-es LED (Thorlabs) fényforrások biztosították, melyet a mérőprogram kontrollált. A méréseket egy Nikon Eclipse Fn1 mikroszkópon végeztük 40 $\times$  vízimmerziós objektívvel, NA: 0,8 (CFI Plan Fluor, Nikon). A fluoreszcencia intenzitását egy XY-pozícionálóra (Thorlabs Inc.) szerelt fotodiódával mértük (PIN-040A; United Detector Technology), melyre egy gyűjtőlencsével fókuszáltuk a beérkező fényt. A dióda áramát egy patch-clamp erősítővel mértük (Axopatch-200A; Molecular Devices).

### 4.6.2 Feszültség-zár fluorometriás mérések COVG technikával

Az Nav1.5 csatornák vizsgálata során alkalmazott COVG méréseket (193, 194) egy speciális erősítővel (CA-1B; Dagan Corporation) végeztük, mely digitalizálón keresztül



csatlakozott az adatrögzítő számítógéphez (Digidata 1440; Molecular Devices) Adatgyűjtéshez és analízishez a Clampex és Clampfit programokat (v10; Molecular Devices) használtuk. A hőmérsékletet 19°C-on tartottuk egy szabályozó rendszerrel (HCC-100A; Dagan Corporation). A mérés egyéb körülményei a TEVC-VCF mérésekhez hasonlóak voltak.

#### 4.6.3 Patch-clamp mérések

A patch-clamp méréseket teljes-sejt, inside-out vagy outside-out patch konfigurációban, feszültség-zár üzemmódban végeztük. A mérésekhez a sejteket 3,5 mm átmérőjű Petri csészében tartottuk, a mérőelektrodát a mikropipettával Burleigh PCS-PS60 mikromanipulátor (Thorlabs, Newton, NJ, USA) segítségével juttattuk a sejtekhez. A méréseket személyi számítógép vezérelt Axon Axopatch 200A, Axopatch 200B, Multiclamp 700B vagy HEKA EPC-9 (HEKA Elektronik) erősítővel és Axon Digidata 1200, 1440 vagy 1550 digitalizálóval rögzítettük (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). Az adatok grafikus megjelenítéséhez és kiértékeléséhez a pCLAMP8-10 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) és a Pulse (HEKA Elektronik) programcsomagot használtuk. A mikropipettákat GC 150 F-7.5 boroszilikát kapillárisokból készítettük (Harward Apparatus, Kent, Egyesült Királyság), melyek belső oldattal feltöltve 2-5 MΩ ellenállást mutattak a külső mérőoldatba helyezve.

A mérések során a tartófeszültséget és a feszültség-protokollok impulzus amplitúdóit és időtartamát a vizsgált ioncsatorna jellemzőihez igazítottuk.

## 4.7 Oldatok

Az elektrofiziológiai mérésekhez használt oldatok összetételét az alábbi táblázat mutatja. A külön nem említett csatornáknál a normál oldatokat használtuk.

Elektrofiziológiai mérésekhez használt oldatok		
Fajtája	Ioncsatorna	Összetétele (mM)
extra-celluláris	normál	145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl <sub>2</sub> , 2,5 CaCl <sub>2</sub> , 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35)
	hKv11.1	140 Choline-Cl, 5 KCl, 2 MgCl <sub>2</sub> , 2 CaCl <sub>2</sub> , 0,1 CdCl <sub>2</sub> , 20 glükóz, 10



		HEPES (pH 7,35)
	oocita (patch-clamp)	1,8 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES + 115 KCl, NaCl, RbCl, CsCl vagy Tris-Cl
intra-celluláris	normál	140 KF, 2 MgCl <sub>2</sub> , 1 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES és 11 EGTA (pH 7,22)
	hKCa1.1	140 KCl, 10 EGTA, 9,69 CaCl <sub>2</sub> , 5 HEPES (pH 7,2, szabad [Ca <sup>2+</sup> ] = 5 μM)
	hKCa3.1	150 K-aszpartát, 5 HEPES, 10 EGTA, 8,7 CaCl <sub>2</sub> , 2 MgCl <sub>2</sub> (pH 7,2, szabad [Ca <sup>2+</sup> ] = 1 μM)
	hKv11.1	140 KCl, 10 EGTA, 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES (pH 7,3)
	oocita (patch-clamp)	1,8 EGTA, 10 HEPES + 115 KCl, NaCl, RbCl, CsCl vagy Tris-Cl

Az emelt K<sup>+</sup> koncentrációjú oldatok (20-150 mM [K<sup>+</sup>]) esetén a NaCl-ot részben vagy egészben KCl-dal helyettesítettük. A 15 mM Ba<sup>2+</sup>-ot tartalmazó oldatban szintén NaCl-ot helyettesítettünk azonos moláris koncentrációjú BaCl<sub>2</sub>-dal. Az alacsony pH-jú oldatokat (< 6,5) 10 mM MES-sel puffereltük HEPES helyett.

Az Nav1.5 csatorna COVG technikával végzett vizsgálata során a következő oldatokat alkalmaztuk: belső oldat (mM): 105 NMG-Mes, 10 Na-Mes, 20 HEPES, és 2 EGTA, pH 7,4. Külső oldat (mM): 25 NMG-Mes, 90 Na-Mes, 20 HEPES, és 2 Ca-Mes<sub>2</sub>, pH 7,4. A kapuzási áram méréséhez Na-Mes-t NMG-Mes-sel helyettesítettük mind a külső, mind a belső oldatban, és a külső oldat 10 μM TTX-et tartalmazott.

Az oldatok elkészítéséhez a vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Peptid toxinok vizsgálata során a tesztelt toxinokat mindig a külső oldatban oldottuk fel a mérni kívánt koncentrációkban, ezért a külső oldatok minden esetben 0,1 mg/ml koncentrációban BSA-t (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) tartalmaztak, hogy elkerüljük peptid toxinok esetleges kikötődését a műanyag felületekhez.

Az oldatok cseréjét a sejtek környezetében gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett. A perfúziós fej 6 bemenettel rendelkezett, azaz egy sejten akár 6 különböző oldat hatását tudtuk mérni. A perfúziós fej

kimeneti oldalát egy PE10-es (0,28 mm belső-, 0,61 mm külső átmérő) cső adta, melynek tölcészerűen kiképzett kifolyó nyílása lamináris áramlással juttatta a tesztelt oldatot a sejtekre.

A pH-méréseknél használt gyors oldatcserét egy két-csővű, 20  $\mu\text{m}$  átmérőjű  $\Theta$ -üveggel oldottuk meg, melynek gyors mozgatásáról egy piezo meghajtó gondoskodott (LSS-3100, Burleigh Instruments).

#### 4.8 Az elektrofiziológiai és VCF mérések kiértékelése

A mért áramgörbéket minden esetben korrigáltuk szivárgási áramra. Ez esetenként mérés közben P/n korrekcióval történt, más esetekben pedig off-line a mérés után. A teljes-sejtes mérések során kapacitás és soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk jellemzően 85%-os mértékig.

A VCF mérések elején rögzítettünk egy fluoreszcencia alapvonalat, melynek során nem változtattuk a feszültséget a megvilágítás alatt. A fotohalványítás által okozott műtermékek kiküszöbölésére ezt az alapvonalat szűrőzés után kivontuk a feszültségprotokoll alatt rögzített görbékből. A fluoreszcencia jelek nagyságát  $\Delta F/F_0$  relatív változással fejeztük ki, ahol  $\Delta F$  a jel amplitúdójában a feszültség változására bekövetkező változás, míg  $F_0$  az alap fluoreszcencia intenzitás.

A kétállapotú feszültség-függő mennyiségeket jellemző adatpontokat, úgy, mint a konduktancia (G-V), fluoreszcencia-változás (F-V) és a kapuzási töltés (Q-V) aktivációja, kétparaméteres Boltzmann-függvénnyel illesztettük a maximális értékre történő normálást követően: pl.  $G(V) = 1 / (1 + \exp[-(V - V_{1/2})/k])$ , ahol  $V_{1/2}$  az 50%-os aktivációhoz tartozó feszültség, míg  $k$  a görbe meredekségét jellemző paraméter.

A toxinok adott koncentrációban mért hatását megmaradó áramhányad formában tüntettük fel (M.Á.H. =  $I/I_0$ , ahol  $I$  a toxin jelenlétében mért áram amplitúdó,  $I_0$  pedig a toxinmentes kontroll oldatban mért áram amplitúdó).

A dózis-hatás görbén a különböző koncentrációkban mért adatpontokra kétparaméteres Hill-egyenletet illesztettünk (M.Á.H. =  $IC_{50}^H / (IC_{50}^H + [Tx]^H)$ , ahol  $IC_{50}$  a félhatásos dózis,  $H$  a Hill-koefficiens,  $[Tx]$  pedig a toxin koncentráció).

Az Nav1.5 csatornák vizsgálatánál az ionáramok és a fluoreszcenciás jelek aktivációja eltérő függvényekkel írható le. Így az összehasonlíthatóság kedvéért ionáramok esetén a maximális amplitúdó 10 és 90%-a közötti időtartamot határoztuk meg, míg a fluoreszcenciás jelek jóval magasabb zaj/jel aránya miatt meghatároztuk az illesztett exponenciális függvény időállandóját, és abból kiszámoltuk az időt, mely ideális exponenciális változás esetén szükséges lenne az amplitúdó 10 és 90% közötti intervallum befutására. Ez alapján az összefüggés az időállandó és a számolt  $t_{10-90\%}$  érték között:  $t_{10-90\%,C} = 2,197\tau$ .

A pH egyedi csatorna paraméterekre kifejtett hatásának vizsgálatához nem-stacionárius zaj analízist alkalmaztunk. -20, 0, 30, 60, 90 mV-os, 15 ms hosszú depolarizáló impulzusokat ismételtünk -100 mV-os tartófeszültségről 250-300 sorozatig, majd kiszámoltuk az egyes feszültségekhez és pH értékekhez tartozó átlag áramokat ( $I$ ) és varianciákat ( $\sigma^2$ ) PulseTools (HEKA) és IgorPro (WaveMetrics) programokkal. A csatornák számát ( $N$ ), az egyedi csatorna áramot ( $i$ ) és a maximális nyitási valószínűséget ( $P_o$ ) az  $I-\sigma^2$  függvény pontjaira illesztett parabolákból határoztuk meg:  $\sigma^2 = i \times I - I^2/N$  alapján.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 5.1 A Kv csatornák kapuzásának vizsgálata

#### 5.1.1 A feszültség-szenzor domén és az aktivációs kapu kölcsönhatásának vizsgálata különböző kationok segítségével.

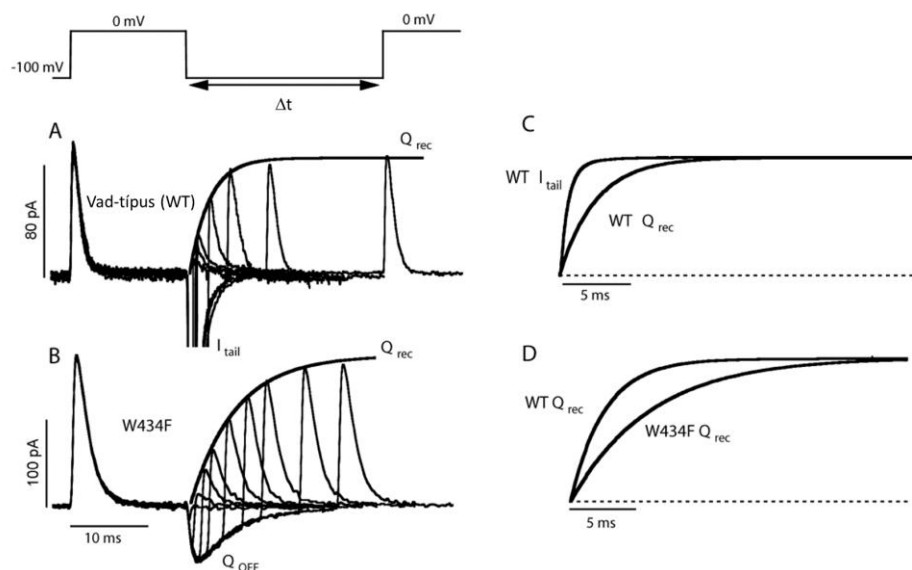
A Kv csatornában a membrán depolarizációját követően a VSD konformáció-változása áttevődik a pórus doménre, és a csatorna nyitását eredményezi (102). Bár léteznek lazább VSD-PD csatolású  $K^+$  csatornák, mint például a Kv7.1, melyekben nem szükséges mind a négy VSD aktivált állapota a pórus nyitásához (106), az általunk vizsgált *Shaker* a lineáris, vagy determinisztikus kapuzású csatornák közé tartozik, melyekben a VSD-k teljes aktivációja megelőzi mind időben, mind feszültség-függésben a pórus nyitását (105). Ennek megfelelően a VSD mozgással együtt járó kapuzási töltés elmozdulása is korábban történik, mint az ionok áramlása a póruson keresztül.

A hiperpolarizáció során végbemenő mozgások sorrendje azonban kevésbé egyértelmű. Az egyik lehetőség, hogy a feszültségváltozás hatására először a VSD mozdul a nyugalmi állapota felé, és egy csatolási mechanizmuson keresztül okozza a pórus záródását a PD-ben. Az is lehetséges azonban, hogy a pórusnak kell először záródnia mielőtt a kapuzási töltés nagy része visszatérhet a nyugalmi állapotba. Mivel a záródás membránpotenciál-függő, az utóbbi eset csak akkor lehetséges, ha maga a kapu is tartalmaz némi kapuzási töltést, vagy a VSD kismértékű elmozdulása lehetővé teszi a kapu záródását, de a nyugalmi állapotba való visszatérésének fő komponense csak a záródás után következik be.

A másik fontos kérdés, amit vizsgálni kívántunk az volt, hogy a pórusban található, azon átáramló ionok befolyásolják-e a kapu nyitásával és zárásával kapcsolatos konformáció-változásokat. Korábbi irodalmi adatok már utaltak arra, hogy mind az aktivációs kapu záródási, mind a kapuzási töltés visszatérési kinetikája függhet a permeáló kationok fajtájától, a kettő együttes szisztematikus vizsgálata azonban tanulmányunk előtt még nem történt meg.

Kísérleteinkben *Shaker* Kv csatornákat vizsgáltunk a patch-clamp technika *inside-out* konfigurációjában különböző ionösszetételű oldatokban (198). Annak érdekében, hogy kapuzási

áramokat is mérhessünk, a permeáló ionok koncentrációját lecsökkentettük, és szimmetrikusra állítottuk be, hogy 0 mV-os depolarizáció esetén nulla legyen rájuk nézve a hajtóerő. A csatornák depolarizáció általi nyitását követően növekvő időtartamú hiperpolarizációs pulzusokat alkalmaztunk, mely alatt egyre több csatorna záródhatott be, és VSD térhetett vissza nyugalmi állapotába. Meghatároztuk a farokáramból a csatornák záródási kinetikáját és a kapuzási áram integráljából a kapuzási töltés visszatérési kinetikáját, mely a VSD mozgását jellemezte (27. ábra). E két relaxációs mechanizmus kinetikáját hasonlítottuk össze a kapuzási lépések megértéséhez (28. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a vad-típusú csatornában a pórus záródási kinetikája lényegesen gyorsabb volt, mint a kapuzási töltés visszatérése (pl. szimmetrikus 1 mM  $K^+$ -ban,  $\tau = 643 \pm 36 \mu s$ , ill.  $2,80 \pm 0,23 ms$ ).  $Cs^+$ ,  $Rb^+$  és  $K^+$  ionok felhasználásával vizsgálva e folyamatokat azt találtuk, hogy a csatorna záródási kinetikája érzékeny volt az ion fajtájára ( $p < 2,2 \times 10^{-9}$ , ANOVA), de a töltés visszatérés sebességét nem befolyásolta ( $p = 0,07$ ; 29. ábra).



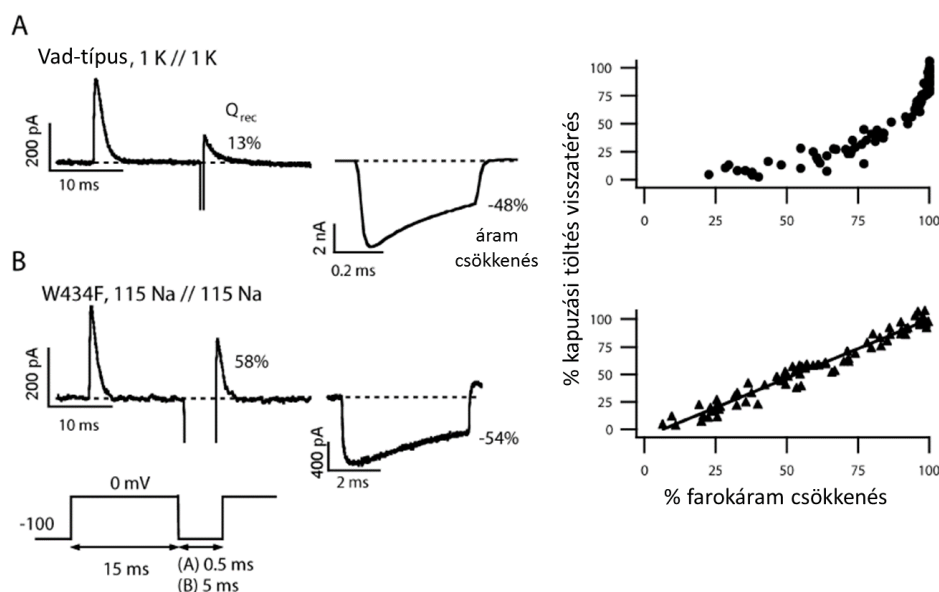
**27. ábra A kapuzási töltés visszatérésének sebessége vad-típusú (WT) és W434F mutáns csatornában.**

(A) A visszatérés sebességét dupla impulzusos protokollal mértük. Két 0 mV-os depolarizáló impulzust alkalmaztunk inside-out konfigurációban, melyek között növekvő időtartamot vártunk -100 mV-on. Az első impulzus váltja ki az ON aktivációs kapuzási áramot, majd nagy befelé irányuló farokáram látható a WT csatornánál a repolarizáló impulzus alatt, majd a második depolarizáló impulzus alatt egyre növekvő ON áram mérhető, ahogy visszatér a kapuzási töltés. (B) Csak OFF deaktivációs kapuzási áram van jelen a nem-vezető mutánsban a repolarizáció alatt. (C) A farokáram lecsengési kinetikájának és a töltés visszatérés kinetikájának összehasonlítása azt mutatja, hogy a csatorna záródása gyorsabb, mint a töltés visszatérése. A görbék az A panelről származnak. (D) A töltés visszatérése gyorsabb a WT csatornában (itt  $\tau = 2,5 ms$ ), mint a mutánsban ( $\tau = 5,9 ms$ ).

Ebből azt állapítottuk meg, hogy a kapuzási töltés visszatérését nem hátráltatja a pórus záródása, mivel az minden kation esetén gyorsabb volt. A hiperpolarizációt követő, a csatorna nyugalmi állapotába visszavezető folyamat során tehát a sebesség-meghatározó lépés a VSD mozgása volt.

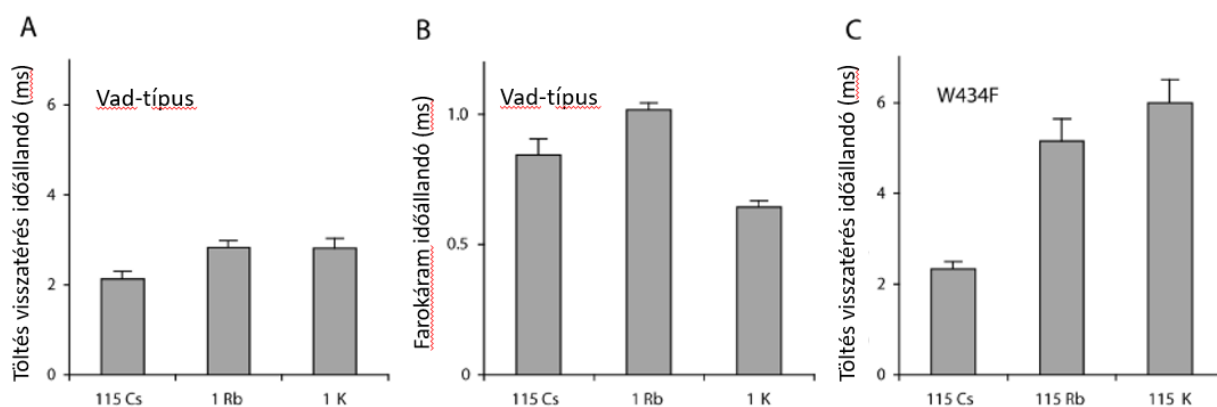
Megismételtük e kísérleteket a W434F mutáns csatornával, melyben a szelektivitási szűrőhöz közeli mutáció egy permanensen inaktivált állapotú, elenyésző  $K^+$  vezetőképességű csatornát hoz létre, mely azonban  $K^+$  hiányában nagy  $Na^+$  permeabilitással bír (199). Ezzel a csatornával drámaian különböző eredményeket kaptunk: a különböző kationok esetén a kapuzási töltés különböző sebességgel tért vissza ( $p < 6 \times 10^{-5}$ , ANOVA) arra utalva, hogy ebben az esetben a pórus a kation fajtájától függő záródása válik a sebesség-meghatározó lépéssé (29. ábra).

Ezen megfigyelések alapján arra következtettünk, hogy a kationok a kapu záródási kinetikáját befolyásolják, mely hatás csak akkor jelentkezik a VSD visszatérési kinetikájában, ha a záródás a sebesség-meghatározó lépés a relaxáció során.



**28. ábra** Kapcsolat a kapuzási töltés visszatérése és a csatorna záródása között WT és W434F mutáns csatornában.

A visszatért kapuzási töltés hányadát a dupla impulzusos protokollal határoztuk meg a második és az első impulzus alatt kiváltott ON kapuzási töltések hányadosaként (bal panelek). A bal oldali panelek farokáramai láthatók a középső paneleken átskálázva. Az oldatok a WT csatornánál (A) szimmetrikus  $1 K^+ + 115 Tris^+$ , míg a W434F mutánsnál (B) szimmetrikus  $115 Na^+$  voltak. (A) A WT csatornánál a töltés visszatérés és a csatorna záródás közötti összefüggés nem lineáris, míg a W434F mutánsnál igen. (A) A bemutatott mérésnél a töltés 13%-a tért vissza, míg a farokáram 48%-ot esett csúcsértékéhez képest. Sok mérés összesített eredménye látható a jobb oldali paneleken (WT:  $n = 29$ , W434F:  $n = 18$ )

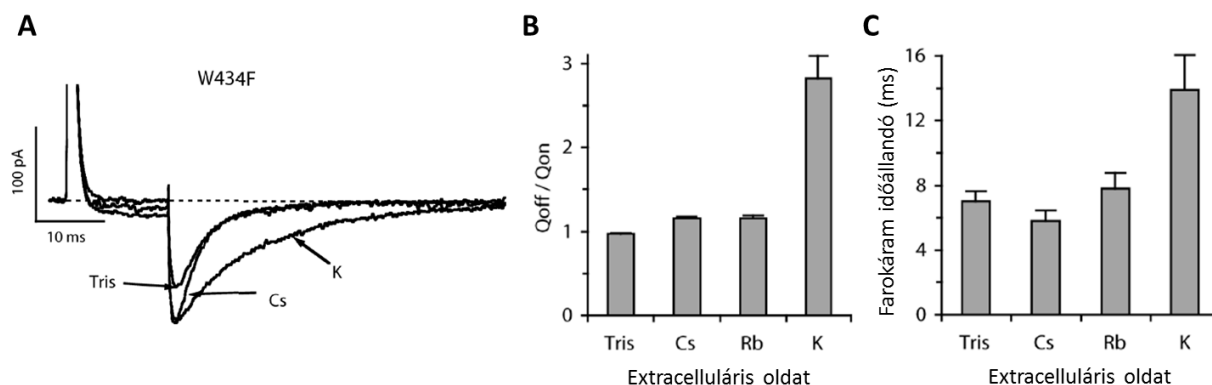


### 29. ábra Töltés visszatérési és farokáram időállandók.

(A) A WT csatornában a töltés visszatérés sebessége hasonló volt a különböző ionok jelenlétében, annak ellenére, hogy különböző volt a csatorna záródás kinetikája ezekben az esetekben (B). Ezzel ellentétesen, a W434F csatornában a töltés visszatérés sebessége jelentősen függött a jelenlévő ionoktól (C).

További vizsgálataink során kiderült, hogy az eddig nem-vezetőnek hitt W434F mutáns csatorna nagy  $K^+$  gradiens esetén kis mértékben képes a  $K^+$  ionok áteresztésére, viszont a vad-típusú csatornával ellentétben a  $Cs^+$  és  $Rb^+$  permeabilitása elenyésző. Ezt a hiperpolarizáció során mért visszatérő (OFF), és a depolarizáció során mért kifelé mozduló (ON) kapuzási töltés hányadosából állapítottuk meg (30. ábra). A póruson át történő ionáramlás esetén ugyanis a hányados lényegesen különbözhet az ionáramlás hiányában mért 1 értéktől. A  $K^+$  esetén mért  $2,82 \pm 0,27$  hányados jelezte számunkra, hogy  $K^+$  ionok áramlanak át a hiperpolarizációs lépés alatt. A  $K^+$  ionok áramlása a póruson keresztül akadályozta a kapu záródását, és így lassította a deaktivációs kinetikát, ezen keresztül pedig a VSD nyugalmi állapotba történő visszatérését. Míg permeáció nélkül  $6,01 \pm 0,45$  ms, addig permeáció során  $13,92 \pm 2,13$  ms volt a töltés-visszatérés időállandója. A két nem permeáló kation esetén ez nem volt megfigyelhető, így a kapuzási töltés lényegesen gyorsabban tért vissza.

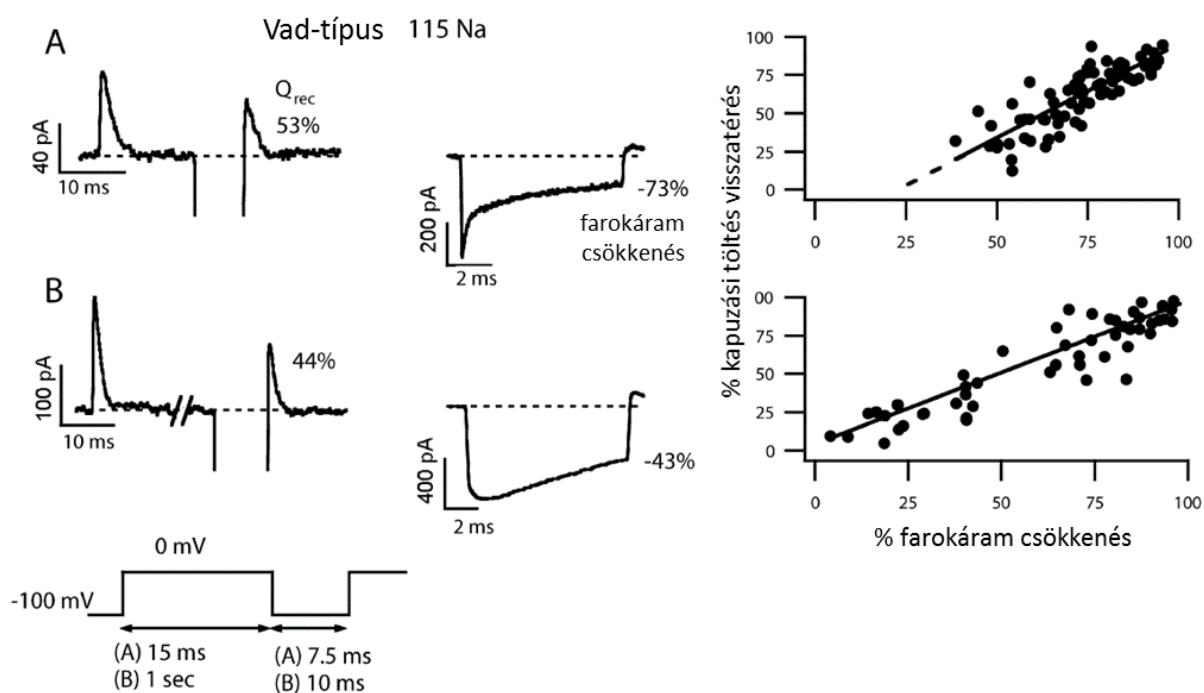




### 30. ábra Detektálható vezetőképesség és lassú csatorna záródás a W434F mutánsban.

Egy outside-out membránfolt külső oldalát 115 mM K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, vagy Tris<sup>+</sup> tartalmú oldatnak tettük ki, míg a pipetta (belső) oldat 115 mM Tris<sup>+</sup>-t tartalmazott. (A) 15-ms hosszúságú, 0 mV-os depolarizáló impulzussal váltottuk ki az áramot, majd visszaléptünk -100 mV-ra. Külső Tris<sup>+</sup> esetén csak az ON és OFF kapuzási áramok láthatók, Cs<sup>+</sup> és Rb<sup>+</sup> (nincs ábrázolva) esetén ezeken felül minimális ionáramok megfigyelhetők, míg K<sup>+</sup> esetén viszonylag jelentős permeáció látható mind a depolarizáló, de főleg a repolarizáló impulzus alatt. (B) Az integrált OFF kapuzási töltés + farokáram és az ON kapuzási töltés hányadosa csak 115 mM K<sup>+</sup> esetén mutat jelentős permeációt ( $Q_{\text{OFF}} / Q_{\text{ON}} = 2,82 \pm 0,27$ ,  $n = 8$ ; permeáció hiányában a hányados értéke 1). (C) A farokáram lecsengése szignifikánsan lassabb volt K<sup>+</sup>-ban, mint a többi ion jelenlétében.

A permanensen inaktíválnak gondolt W434F mutánsban a kapuzási töltés visszatérésének kinetikája még ionáramlás hiányában is számottevően lassabb volt, mint a vad-típusú csatornában ( $6,01 \pm 0,45$  ms, ill.  $2,80 \pm 0,23$  ms). Hipotézisünk szerint az inaktiváció folyamata megváltoztatja az aktivációs kapu és a VSD kapcsolatát, oly módon, hogy a pórus záródása lényegesen lelassul, és az válik sebesség-meghatározó lépéssé. E hipotézis ellenőrzésére vad-típusú csatornákat is vizsgáltunk K<sup>+</sup>-mentes, Na<sup>+</sup> ionokat tartalmazó oldatokban, mivel ismert, hogy ezen Kv csatornák az inaktivációt követően K<sup>+</sup> ionokat nem, de Na<sup>+</sup> ionokat képesek vezetni az átalakult szelektivitási szűrő miatt. Azt tapasztaltuk, hogy rövid, inaktivációt nem indukáló impulzusokat követően a csatorna záródása gyorsabb volt, mint a VSD visszatérése, hasonlóan a K<sup>+</sup> ionok jelenlétében megfigyeltekhez. Amikor azonban a depolarizáció kellően hosszú volt az inaktiváció kiváltásához, a W434F mutánshoz hasonlóan a csatorna záródása lelassult, és hátráltatta a VSD visszatérését (31. ábra).



**31. ábra** Kapcsolat a töltés visszatérés és csatorna záródás között a WT csatornában szimmetrikus 115 mM Na<sup>+</sup> oldatban.

Az ábra a korábban leírtaknak megfelelően készült. (A) A Na<sup>+</sup> farokáram legalább két komponensű a WT csatornában rövid (< 60-100 ms) depolarizáló impulzusok után. Egy 15 ms-os depolarizáló impulzus után ~30%-a a farokáramnak a gyors komponenssel cseng le (középső panel), emiatt a töltés visszatérése késik a csatorna záródáshoz képest (jobb panel). (B) Egy 1000 ms-os depolarizáló impulzus után a farokáram gyors komponense eltűnik, és a kapcsolat a töltés visszatérés és a csatorna záródás között 1:1 lineárisra válik, mint a W434F mutánsban.

Ezen eredményeink tehát rámutattak arra, hogy hiperpolarizációt követően az aktivációs kapu záródása minden esetben megelőzi a VSD visszatérését. Fiziológiai körülmények között az aktivációs kapu minimális töltést hordozva, de igen gyorsan, és a permeáló ion fajtájától függő sebességgel záródik be, és a VSD visszatérése jóval lassabban ezt követően történik meg. Hosszú depolarizációt követően azonban az inaktiváció hatására a csatorna záródása lassúvá, s ezzel sebesség-meghatározóvá válik, ezáltal hátráltatva a VSD visszatérését a nyugalmi állapotba. E megállapításunkat később ciszteinnel reagáló MTS reagensekkel történt független kísérletekkel megerősítették (200).

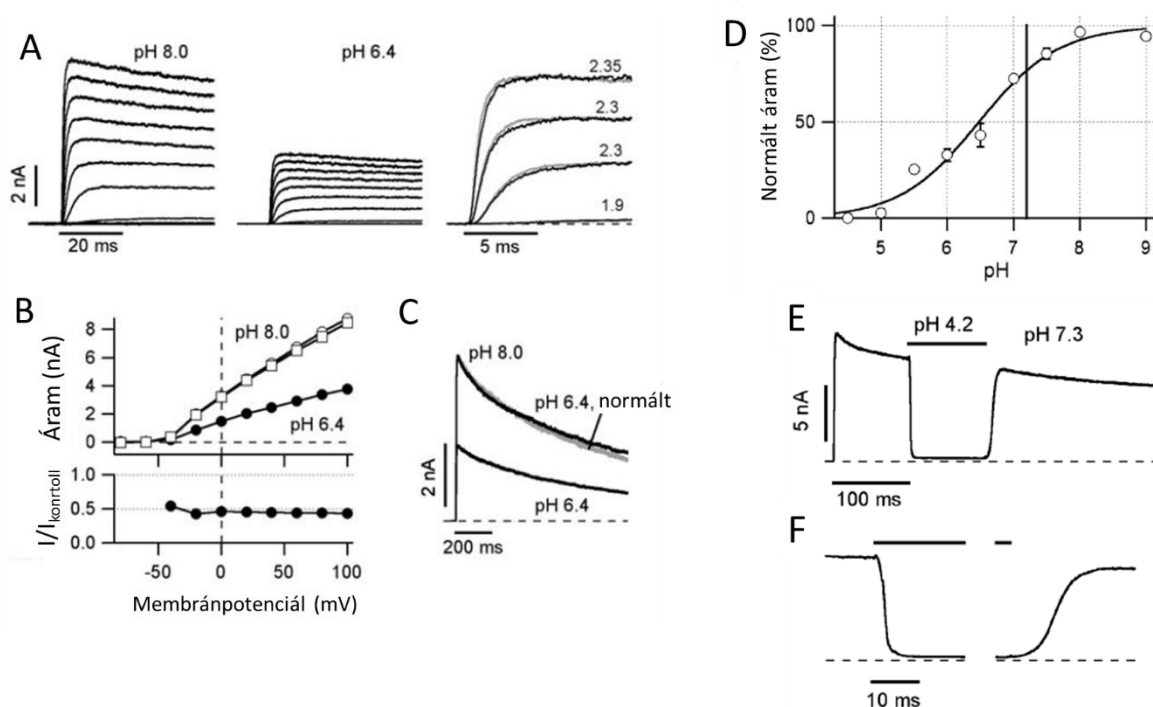
### 5.1.2 Az intra- és extracelluláris pH csökkentésének hatása a K<sub>v</sub> csatornák kapuzására

Az intra- és extracelluláris közeg savasításának a K<sub>v</sub> csatornák kapuzására gyakorolt hatását már több tanulmány jelezte (114, 120), azonban mi végeztük el az első szisztematikus

vizsgálatot, melynek során a háttérben álló mechanizmusokat is feltártuk. Vizsgáltuk, hogy a Shaker K<sub>v</sub> csatorna pórusát képesek-e valamelyik oldalról blokkolni a protonok, és hogy felléphet-e permeáció a póruson át. Arra is kerestük a választ, hogy az aktivációs vagy inaktivációs kapuzási lépéseket módosítja-e a pH változtatása. Kísérleteinket *Xenopus* oocitákból kiszakított *inside-out* és *outside-out* membrán darabokon mértük gyors-perfúziós rendszerrel (201).

Inside-out membrándarabok citoplazmatikus oldalát különböző pH-jú oldatokkal perfundálva az áram csökkenését figyeltük meg alacsony pH-n (32. ábra). A 6,4-es és 8,0-as pH értéken mért áramokat egymáshoz skálázva kiderült, hogy sem az áram aktivációs, sem az inaktivációs kinetikája nem változott jelentős mértékben: az alacsony pH-n mért áram egy kb. kétszeres faktorial leskálarástól eltekintve azonos volt a kontroll árammal. A gátlás a kontroll pH-ra visszatérve teljes mértékben reverzibilisnek bizonyult. A gátlás mértékét a pH függvényében ábrázolva meghatároztuk a gátlás pK értékét, melyre 6,5-öt kaptunk, ami azt mutatja, hogy már a fiziológiás pH 7,2-7,4 tartományban is az áram jelentős hányadát gátolják a protonok. Emiatt a kísérletek további részében pH 8,0 oldatot használtunk kontrollnak.

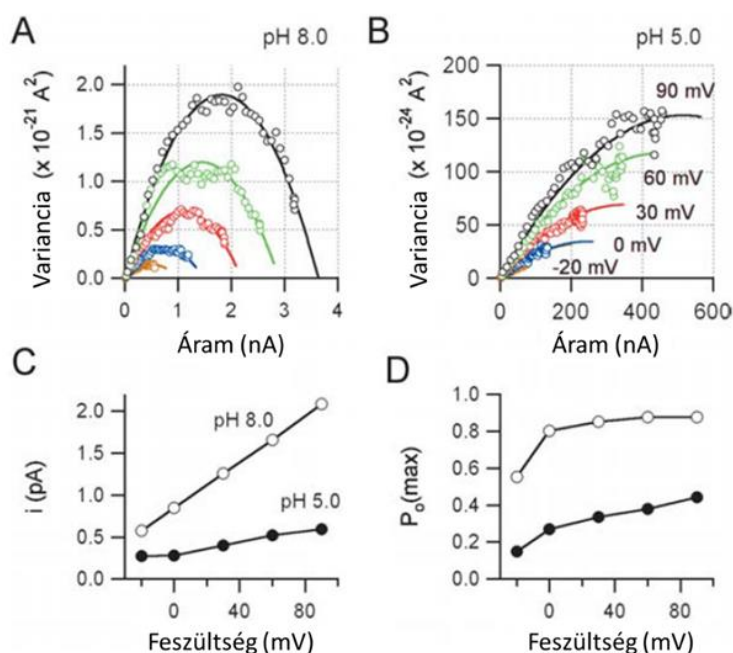
Különböző mértékű depolarizáló lépéseket alkalmazva kiderült, hogy a gátlás feszültség-független, ami arra utal, hogy a protonok nem hatolnak mélyen a szelektivitási szűrőbe, ahol a transzmembrán potenciál nagy része esik. A gátlás kinetikáját gyors perfúzióval vizsgáltuk, mely lehetővé tette az oldat cseréjét < 2 ms idő alatt. Eredményeink azt mutatták, hogy a gátlás a rendszerünk időbeli feloldási határán belül kialakult, azaz igen gyors. A kimosás kinetikája szintén gyors volt, viszont konzisztensen lassabb, mint a gátlás kialakulásának kinetikája és szigmoid kinetikát követett. Bár nem bizonyítottuk további kísérletekkel, ennek lehetséges magyarázata, hogy több proton kötőhely van a szelektivitási szűrő intracelluláris bejáratánál, melyek közül egy betöltöttsége elegendő a gátlás kialakulásához.



**32. ábra** *Xenopus* oocitákban kifejezett Shaker csatornák gátlása intracelluláris protonok által inside-out konfigurációban.

(A) -80-tól +100 mV-ig terjedő depolarizációkkal, 20 mV-os lépésekben kiváltott áramok. A bal panelen pH 8,0-on, középen pH 6,4-en mért áramok, míg a jobb panelen a 6,4-en mért áramok jelzett értékkel felskálázva és fedésbe hozva a pH 8,0-on mért görbékkel láthatók. (B) A felső panelen az áram-feszültség (I-V) összefüggés látható pH 8,0 (üres kör), pH 6,4 mellett (tele kör), és kimosást követően (üres négyzet). Az alsó panel a pH 6,4-en és pH 8,0-on mért áramok hányadosát mutatja, ami feszültség-független gátlásra utal. (C) +40 mV-os depolarizáció alatt mért áramok. A felskálázott pH 6,4-en mért áram jó átfedést mutat a pH 8,0-on mért árammal, ami protonok C-típusú inaktivációra kifejtett hatásának hiányára utal. (D) Az intracelluláris proton gátlás dózis-hatás görbéje +40 mV-nál Hill egyenlettel illesztve. A függőleges vonal a pH 7,2-t jelenti, ami az oocita kísérletekben gyakran használt intracelluláris pH. (E) Az alacsony pH-jú oldat gyors alkalmazása inside-out konfigurációban. A membránt +60 mV-ra depolarizáltuk, és az impulzus alatt cseréltük az intracelluláris oldatot pH 7,3-ról pH 4,2-re, a vízszintes vonallal jelölt időtartamra. (F) Az áram változása felnagyított időskálán.

Zaj-analizist alkalmazva megállapítottuk, hogy az áram csökkenésének oka elsősorban az egyedi csatorna vezetőképesség csökkenése, és kisebb mértékben a nyitási valószínűség csökkenése. Ezek alapján a gátlás mechanizmusát az extracellulárisan alkalmazott tetraetil-ammónium (TEA) gátlásához hasonlónak gondoljuk, mely olyan nagy sebességű asszociációs és disszociációs lépéseket jelent, ami a mérőrendszer feloldóképességét meghaladja, s így egy látszólag csökkent egyedi csatorna vezetőképesség figyelhető meg (33. ábra).

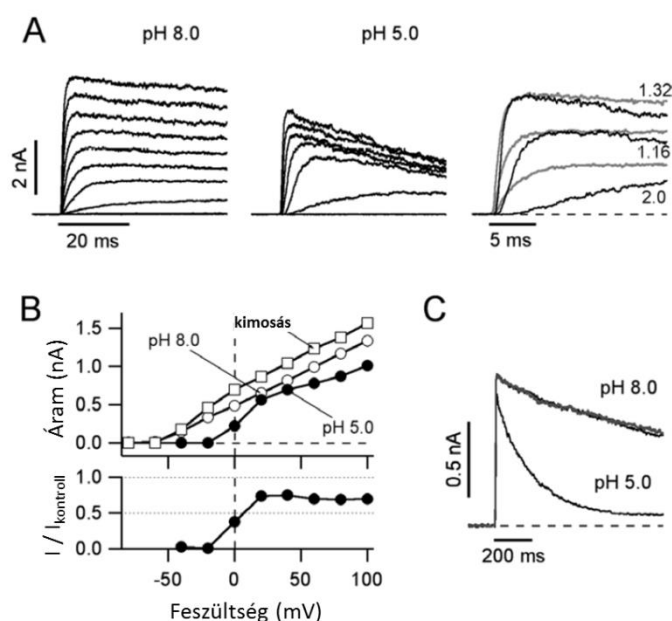


**33. ábra** Az intracelluláris savasítás hatása Shaker T449V mutáns csatornák egyedi csatorna paramétereire.

Nem-stacionárius áram fluktuációkat mértünk 15 ms-os -20, 0, 30, 60, és 90 mV-ra történő depolarizációk során. 250 sorozatot mértünk pH 8,0-n és 300 sorozatot pH 5,0-n. Az így meghatározott variancia látható az áram függvényében pH 8,0 (A) és pH 5,0 (B) esetén. A fekete vonalak az illesztett parabolákat mutatják. (C) Egyedi csatorna áram a feszültség függvényében. (D) A 15 ms-os depolarizációk alatt elért maximális nyitási valószínűség.

Érdekes módon az intracelluláris alacsony pH gyorsította a farokáramok kinetikáját, ami nem lehetett felszíni töltés-árnyékolási effektus (surface charge screening) eredménye, mivel annak éppen ellenkező irányba kellett volna változtatnia a kinetikát. Feltételezésünk szerint a protonok kompetálnak a csatornába belépő  $\text{K}^+$  ionokkal, melyek akadályozzák az aktivációs kapu záródását. A proton jelenléte a csatorna bejáratánál megfigyeléseink alapján viszont lehetővé teszi a kapu záródását, ezért koncentrációjának növekedésével gyorsul a kapu záródása. Ezzel ellentétben viszont az inaktiváció sebességét nem módosította az intracelluláris pH. Ez a megfigyelés nem meglepő annak fényében, hogy az inaktiváció a szelektivitási szűrő extracelluláris végéhez közel megy végbe.

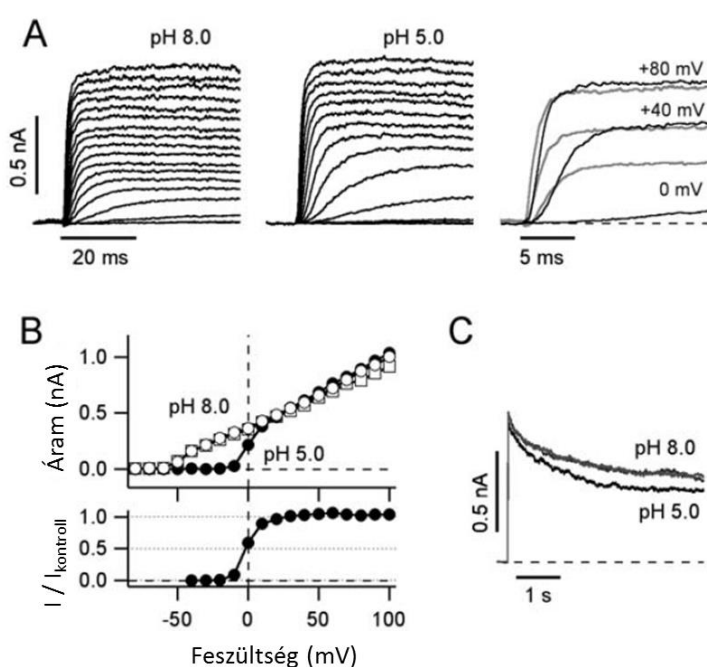
Az extracelluláris oldali savasítás teljesen más hatással volt a csatornák kapuzására (34. ábra). Megfigyeltük a már ismert töltés-árnyékolási effektust, aminek hatására pH 8,0-ról pH 5,0-ra váltva a VSD mintegy 45 mV-tal negatívabb feszültséget érzékel, s így ennyivel eltolódik a nyitáshoz szükséges membránpotenciál a pozitív irányba, valamint felgyorsul a farokáram a látszólag negatívabb feszültség miatt. Az extracelluláris pH fiziológiás tartományon belüli csökkenése nem blokkolta a csatornákat, csak jóval alacsonyabb értékek esetén okozta a csatornák lassú inaktivációjának gyorsulását.



### 34. ábra Az extracelluláris savasítás hatása a Shaker csatornákra.

(A) -80-tól +100 mV-ig terjedő depolarizációk által kiváltott áramok pH 8,0 (bal panel) és pH 5,0 (középen) esetén. A jobb panelen feketével a pH 5,0-n mért, a jelzett faktorról felskálázott áramok láthatók a pH 8,0-n mért áramokkal (szürke) fedésbe hozva. (B) A felső panelen az áram-feszültség (I-V) összefüggés látható pH 8,0 (üres kör), pH 5,0 mellett (tele kör), és kimosást követően (üres négyzet). Az alsó panel a pH 5,0-en és pH 8,0-on mért áramok hányadosát mutatja. (C) Áramok +60 mV-nál pH 8,0-n, majd 5,0-n és újra 8,0-n kiterjesztett időskálán.

Ez utóbbi hatás kiküszöbölése érdekében alkalmaztuk az erősen csökkent C-típusú inaktivációt mutató T449V mutáns (35. ábra). Ennél a mutánsnál még pH 5,0 esetén sem tapasztaltunk áramcsökkenést vagy az inaktiváció gyorsulását, tehát a vad-típusnál megfigyelt hatás a C-típusú inaktiváció befolyásolásán keresztül valósult meg. Az inaktiváció gyorsulásának mértéke igen nagymértékű volt: pH 4,0-nál 200-szor gyorsabb volt az inaktiváció, mint pH 8,0-nál. A dózis-hatás görbe alapján  $pK_a = 4,7$ /alegység értéket kaptunk, ami egy savas oldalláncú aminosav protonálására utal. A legvalószínűbb jelölt a 447-es pozíciójú aszpartát, mely a szelektivitási szűrő extracelluláris végéhez közel helyezkedik el, ahol az inaktivációval kapcsolatos konformáció-változások mennek végbe.



### 35. ábra Az extracelluláris savasítás hatása a csökkent inaktivációjú T449V mutánsra.

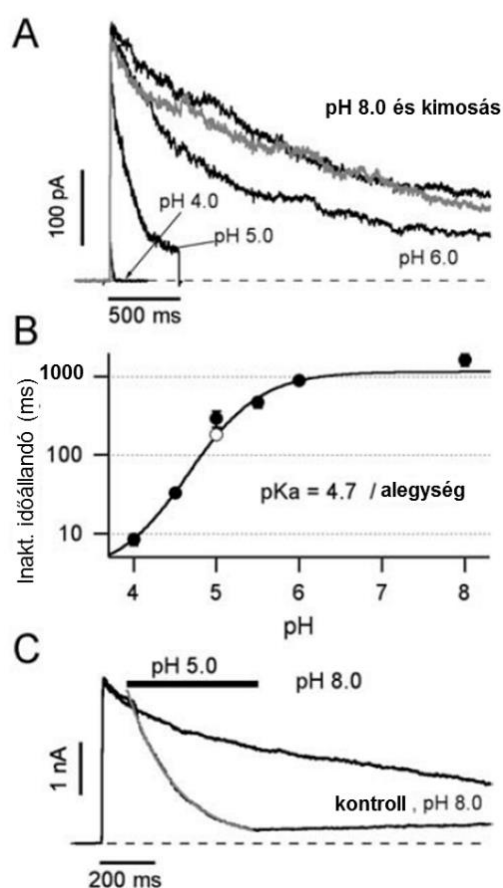
(A) -80-tól +100 mV-ig terjedő depolarizációk által kiváltott áramok pH 8,0 (bal panel) és pH 5,0 (középen) esetén. A jobb panelen feketével a pH 5,0-n mért skálázás nélküli áramok láthatók a pH 8,0-n mért áramokkal (szürke) fedésbe hozva. (B) A felső panelen az áram-feszültség (I-V) összefüggés látható pH 8,0 (üres kör), pH 5,0 mellett (tele kör), és kimosást követően (üres négyzet). Az alsó panel a pH 5,0-en és pH 8,0-on mért áramok hányadosát mutatja. (C) Az áramok +60 mV-nál pH 8,0-n, majd 5,0-n és újra 8,0-n minimális hatást mutatnak a T449V mutáns csatornára.



A protonok C-típusú inaktivációt módosító hatásának vizsgálatához egy +60 mV-os depolarizáló impulzus alatt alkalmaztunk egy gyors rövid pH 5,0-ös impulzust. Ahogy a 36. ábrán látható, az eredetileg lassú inaktivációs kinetika azonnal felgyorsult az alacsony pH hatására, és pH 8,0-as oldalra visszaváltva csak nagyon lassú visszatérést tapasztaltunk, ami azt mutatja, hogy a pH 5,0-ös periódus indukálta a C-típusú inaktiváció kialakulását.

Csatorna-gátlást még befelé folyó áramok esetén sem figyeltünk meg, ami azt bizonyítja, hogy a protonok nem tudnak belépni a szelektivitási szűrőbe, és nincsen proton permeabilitás a  $K_v$  csatorna pórusán keresztül. Ezt pH 2 értékig ellenőriztük.

Összességében tehát megállapítottuk, hogy intracellulárisan a protonok gátolják a  $K_v$  csatornákat már fiziológiás pH tartományban is, aminek élettani relevanciája is lehet. Az extracelluláris oldalról viszont csak jóval alacsonyabb pH tartományban befolyásolják az inaktiváció mechanizmusát, felgyorsítva azt. Ez a hatás mégis releváns lehet alacsony extracelluláris pH-jú, pl. gyulladásos területeken, mivel a töltés-árnyékolási effektussal együtt a csatornák aktivációját hátráltatva, inaktivációját pedig felgyorsítva, lényegesen csökkentheti a  $K^+$  konduktanciát, módosítva ezzel a sejt ingerelhetőségét.



**36. ábra A C-típusú inaktiváció felgyorsulása extracelluláris protonok hatására.**

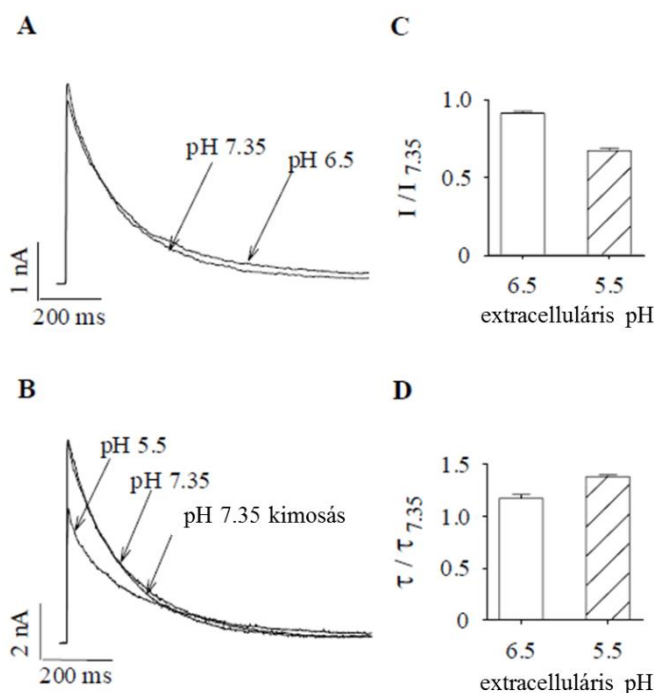
(A) Shaker csatornákat expresszáló membránfoltokat depolarizáltunk +60 mV-ra a jelölt pH értékek mellett. Az inaktiváció drasztikus felgyorsulása figyelhető meg. (B) A inaktiváció sebességét az áramgörbék lecsengő száraira illesztett egy-exponenciális függvények időállandóival jellemeztük. Az időállandókat a pH függvényében ábrázoltuk. A folytonos vonal az illesztést mutatja, mely azon alapul, hogy az egyes alegységek egyedileg hatnak kölcsön a protonokkal. (C) Egy +60 mV-ra történő depolarizáció alatt alkalmazott gyors pH 5,0-s impulzus. Az impulzus alatt csökkenést mutató áramra illesztett egy-exponenciális függvény időállandóját üres körrel jeleztük a B panelen.



### 5.1.3 A Kv1.3 csatorna inaktivációjának extracelluláris pH-függése

A *Shaker* családba tartozó Kv csatornák fent leírt inaktivációja a „láb az ajtóban” (foot-in-the-door) mechanizmusnak megfelelően csak akkor mehet végbe, ha egy  $K^+$  ion kötőhely a pórusban kiürül, vagyis az ott lévő ion távozik (202). A lassú inaktiváció sebességét erősen befolyásolja az extracelluláris pórusrégió aminosav sorrendje, különösképpen a *Shaker* csatorna 449-es pozíciójának megfelelő helyen található aminosav (114). Ezen felül az inaktiváció sebessége módosítható gátlószerekkel (pl. tetraetil-ammónium), valamint az extracelluláris oldat kation összetételének és pH-jának változtatásával.

Az irodalomból ismert, hogy több, a *Shaker* családba tartozó csatorna inaktivációs kinetikáját módosítja az extracelluláris pH ( $pH_e$ ) (123, 124, 126). Különösen figyelemreméltó, hogy míg minden más csatornánál a kinetika előző részben leírt gyorsulása figyelhető meg a pH csökkenésével, addig a humán T-sejtek domináns, és a proliferációban kulcsszerepet játszó Kv1.3 csatornájának esetében lassul a lassú inaktiváció (37. ábra) (120). Fontos és egyedülálló tulajdonsága a pH érzékenység szempontjából, hogy a kritikus (*Shaker* 449-cel ekvivalens) pozícióban egy titrálható hisztidin található (H399).



**37. ábra Az extracelluláris pH csökkentése lassítja a Kv1.3 áram inaktivációs kinetikáját és csökkenti amplitúdóját.**

(A) Kv1.3 csatornákat expresszázó CTLL-2 sejteket depolarizáltunk +50 mV-ra teljes-sejt konfigurációban a jelölt extracelluláris pH mellett. pH 6,5 csak kis mértékű változásokat okozott. (B) A  $pH_e$  5,5-re csökkentése reverzibilisen és jelentős mértékben csökkentette az amplitúdót, és lassította az inaktivációt. (C) Az áramamplitúdó csökkenése alacsony  $pH_e$  esetén. (D) Az inaktiváció lassulása alacsony  $pH_e$  esetén. Az áramgörbék lecsengő szárára illesztett egy-exponenciális függvények időállandóinak arányát ábrázoltuk a pH 7,35-ön mért időállandóhoz képest.

A lassú inaktiváció pH-függése fontos szabályozó mechanizmus lehet például gyulladásos területeken, ahol a környezet pH-ja jelentősen eltérhet a fiziológiás értéktől. Mivel a humán limfociták membránpotenciálját elsősorban a Kv1.3 csatornák határozzák meg, ezek működésének a pH változása által okozott módosulása befolyásolja a sejtek membránpotenciálját és ezen keresztül számos sejtfunkciót. Nevezetesen, gyulladásos, alacsony pH-jú területen a Kv1.3 csatornák lassabb inaktivációja miatt átlagosan hosszabb ideig tartanak nyitva e csatornák. Ez negatívabb membránpotenciált eredményez, ami kedvez a limfociták aktivációja során kialakuló jelátviteli folyamatoknak, és így a sejtek proliferációjának.

E tanulmány első részét Dr. Panyi György már felhasználta MTA doktori értekezésében, de mivel a második rész megértéséhez szükséges az előzetes eredmények ismerete, ezeket az eredményeket részletes kifejtés és ábrák bemutatása nélkül lista formájában ismertetem.

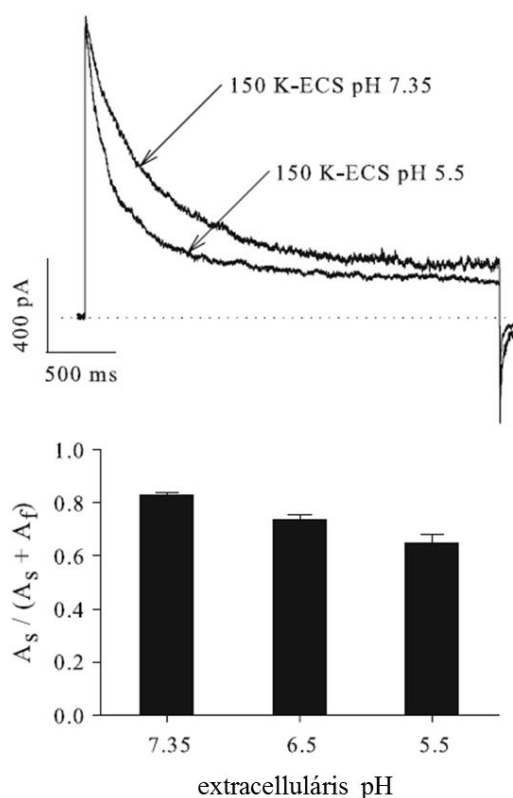
Mérési eredményeink alapján felállítottunk egy modellt, mely szerint a Kv1.3 csatorna inaktiváció szempontjából fontos 399-es pozíciójában levő hisztidin protonálódik alacsony pH-n, az így kialakuló elektrosztatikus tér akadályozza az inaktiváció sebességét meghatározó  $K^+$  kötőhelyről a  $K^+$  ion távozását, ezáltal megnöveli annak átlagos betöltöttségét és lassítja az inaktivált állapot kialakulását (203). Ezen kísérletekhez ideális a  $Ba^{2+}$  ionok használata, amelyekre a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák permeábilisak, de a  $Ba^{2+}$  nagyobb töltése miatt erősebben kötődik az egyes kötőhelyekhez, így a póruson keresztüli mozgása is lassabb.

Modellünket több eredményünk támasztotta alá:

1. A hisztidint más aminosavra mutálva a többi csatornánál is megfigyelt gyorsulás következett be az inaktivációban.
2. Magas ionerősségű oldatot (High Ionic Strength =HIS, mely 96,25 mM  $MgCl_2$ -t tartalmazott) alkalmazva a vad-típusú (WT) csatornában is az inaktiváció gyorsulása volt megfigyelhető alacsony pH-n. Ennek magyarázata, hogy a magas ionerősség leárnyékolta a protonált hisztidin elektromos terét, így eltűnt a  $K^+$  kilépését hátráltató potenciálgát.
3. Az inaktivációt kontrolláló  $K^+$  kötőhelyre kötődött  $Ba^{2+}$  ion kimosódási kinetikája lelassult alacsony pH esetén, arra utalva, hogy a kialakult potenciálgát akadályozza a kötőhely elhagyását.
4. A  $Ba^{2+}$  disszociáció sebessége nem függött a pH-tól a H399K és H399L csatornák esetén, ahol nem volt protonálható a kritikus pozíciójú aminosav.

5. A  $\text{Ba}^{2+}$  disszociáció sebessége azonos volt a WT csatornából pH 5,5-nél a H399K csatornában mért értékkel, valamint a WT csatornából pH 7,35-nél a H399L csatornával mért értékkel.

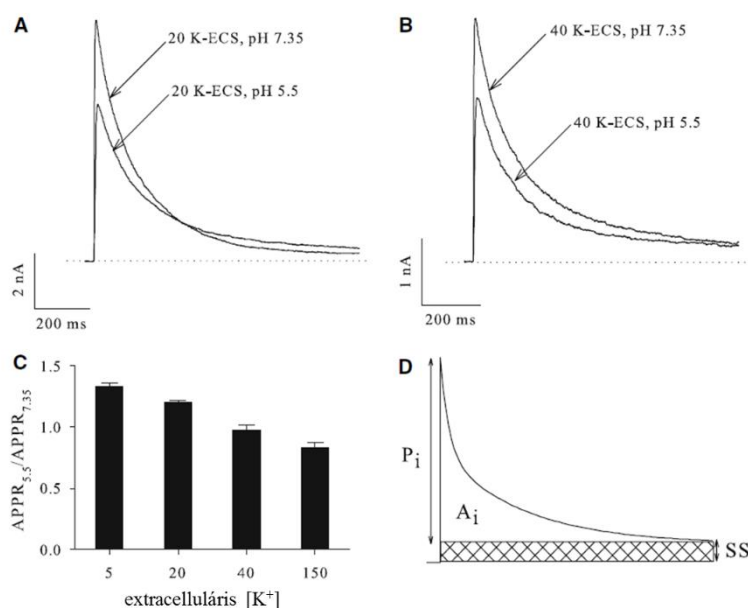
A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a pórus extracelluláris bejáratánál elhelyezkedő protonált hiszitidin által létrehozott potenciálgát a kívülről a pórusba belépő kationokat is akadályozza-e. Ennek érdekében vizsgáltuk az alacsony extracelluláris pH hatását megemelt külső  $\text{K}^+$  koncentráció ( $[\text{K}^+]_e$ ) alkalmazása mellett (38. ábra). Ilyen körülmények között a modell szerint az inaktivációt kontrolláló kötőhely betöltődése növekvő  $[\text{K}^+]_e$  esetén egyre inkább az extracelluláris tér felől történik, melyet a pozitív oldallánc jelenléte akadályoz, s így az inaktiváció gyorsulását eredményezi. A modell predikciójának megfelelően, alacsony pH mellett az inaktiváció gyorsulása volt megfigyelhető a 40-150 mM extracelluláris  $\text{K}^+$  koncentráció-tartományban. Az inaktivációs kinetika analízise azonban nehézkes emelt  $[\text{K}^+]_e$  esetén, mivel – korábban már leírt módon – a lecsengés legalább két komponensűvé válik, és több időállandó és amplitúdó jelenik meg az összehasonlításban (204).



**38. ábra** Az extracelluláris savasítás hatása a *Kv1.3* inaktivációjára magas extracelluláris  $\text{K}^+$  esetén. (Felső panel) *Kv1.3* csatornákat kifejező CTTL-2 sejteket depolarizáltunk 3 s időtartamra +50 mV-ra -120 mV tartófeszültségről. A K-ECS extracelluláris oldat 150 mM  $\text{K}^+$ -ot tartalmazott. pH 7,35-ről pH 5,5-re váltva az inaktivációs kinetika felgyorsult. (Alsó panel) Az áram lecsengése két exponenciális komponens összegeként volt illeszthető. A pH csökkenésével a lassú komponens ( $A_s$ ) aránya csökkent a teljes amplitúdóban ( $A_f + A_s$ ).

Ennek kiküszöbölésére bevezettünk egy, a komplex kinetikával lecsengő áramot egyetlen idő dimenziójú számmal jellemző mennyiséget, amit APPR-nek (Area / Peak Ratio) nevezünk el. Ezt úgy határoztuk meg, hogy megmértük az áramgörbe alatti területet (Area = a görbe integrálja = töltés) levonva belőle a steady-state áramszinthez tartozó területet (töltést), és ezt osztottuk az áramgörbe amplitúdójával (Peak), melyből előtte szintén levontuk a steady-state áramszintet (39. ábra). Mivel egy exponenciális lecsengésű görbe teljes integrálja  $A \times \tau$  - val egyenlő, ahol A az amplitúdó,  $\tau$  pedig az időállandó, az integrál és az amplitúdó hányadosa az időállandót adja meg. Az APPR segítségével így tehát a komponensek számától és a relatív amplitúdóktól függetlenül egyetlen számmal jellemezhetjük és hasonlíthatjuk össze különböző körülmények között az inaktivációs kinetikát.

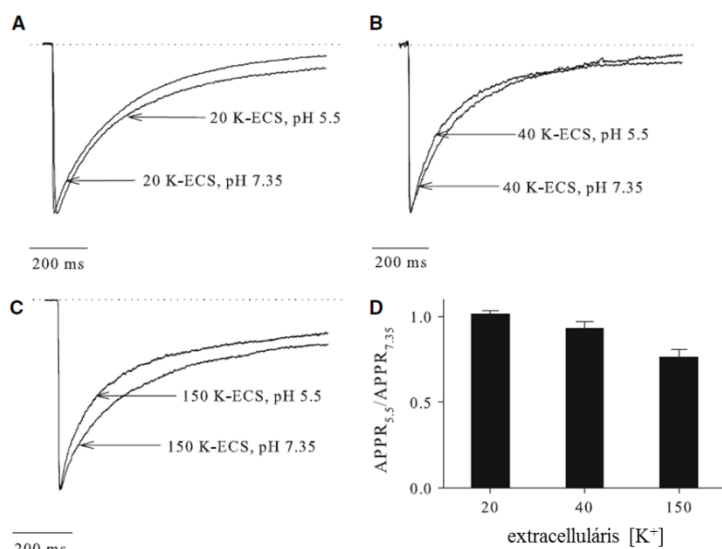
### 39. ábra A savasítás inaktivációra gyakorolt hatásának $[K^+]_e$ függése



(A) Míg  $[K^+]_e = 20$  mM esetén a pH csökkentése lassította az inaktivációt, addig (B)  $[K^+]_e = 40$  mM esetén már kismértékű gyorsulás volt megfigyelhető. (C) Meghatároztuk az áramamplitúdókat és az áramgörbék alatti területeket +50 mV-os depolarizációk alatt, majd kiszámoltuk a terület / csúcsáram hányadosokat (area per peak ratio = APPR) pH 7,35 (APPR<sub>7,35</sub>) és pH 5,5 (APPR<sub>5,5</sub>) esetén. Ezek hányadosát ábráztuk a  $[K^+]_e$  függvényében. (D) Az APPR meghatározása. Az áramamplitúdó inaktiválódó komponensét ( $P_i$ ) az egyensúlyi ( $SS$ =steady-state) komponens abszolút csúcsból történő levonásával kaptuk. Az inaktiválódó komponenshez tartozó töltést ( $A_i$ ) a teljes görbe alatti területből az  $SS$  komponenshez tartozó komponenst (sátrózott rész) levonva kaptuk. Az APPR érték az  $A_i / P_i$  hányadosként adódik.

A modell alapján feltételeztük, hogy ha az áram irányát a  $K^+$  koncentrációk változtatásával megfordítjuk, akkor a befelé irányuló  $K^+$  áramlás esetén a kötőhely töltődése még hangsúlyosabban kívülről történik, és a pH csökkentése még inkább az inaktiváció

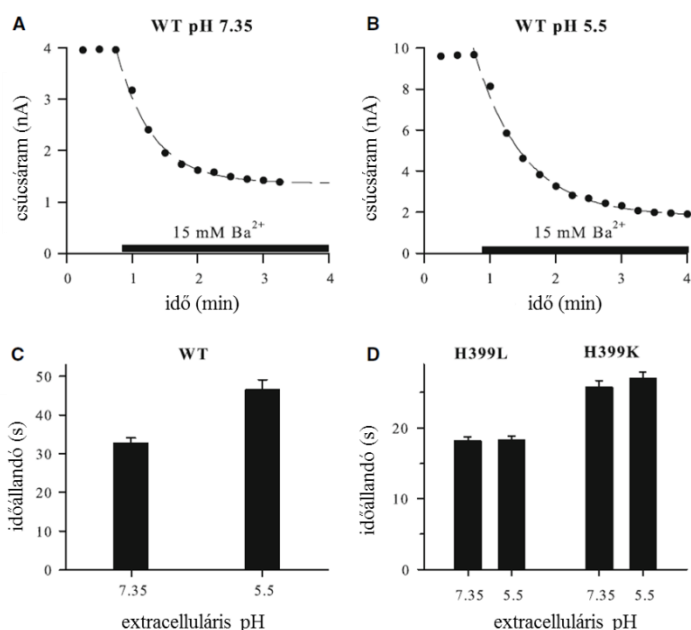
gyorsulásának irányába fog hatni. Ennek megfelelően befelé irányuló áramok esetén, az áramok inaktivációját gyorsította az alacsony extracelluláris pH a 20-150 mM extracelluláris  $K^+$  koncentráció-tartományban (40. ábra). Míg kifelé irányuló áramok esetén 40 mM  $[K^+]_e$  fölött okozott inaktiváció gyorsulást az alacsony pH, addig befelé irányuló áramok esetén ez már 20 mM  $[K^+]_e$  fölött bekövetkezett.



**40. ábra A savasítás inaktivációra gyakorolt hatásának  $[K^+]_e$  függése befelé folyó áramok esetén**

(A-C) Teljes-sejt  $K^+$  áramok CTLL-2 sejteken 2 s hosszú, +20 mV-os depolarizáló impulzusok alatt. A pipetta oldat 5 mM  $K^+$ -ot tartalmazott, így a  $K^+$  egyensúlyi potenciál minden esetben pozitívabb volt +20 mV-nál, ezért befelé irányultak az áramok. Az extracelluláris oldat 20 (A), 40 (B) vagy 150 mM (C)  $K^+$ -ot tartalmazott, és az áramokat rögzítettük pH 7,35 és pH 5,5 esetén is. Az áramokat normáltuk az inaktivációs kinetika könnyebb össze-hasonlíthatóságának érdekében. (D) Az  $APPR_{5.5} / APPR_{7.35}$  hányadosokat ábrázoltuk különböző  $[K^+]$  értékek mellett.

A korábbi,  $Ba^{2+}$  ionok kimosódási kinetikáját vizsgáló kísérletekhez hasonlóan, azt is vizsgáltuk, hogy a protonált hisztidin lassítja-e a  $Ba^{2+}$  ionok pórusba történő belépését az extracelluláris térből. Ehhez összehasonlítottuk a  $Ba^{2+}$  által vad-típusú, valamint H399L és H399K mutáns csatornákon okozott gátlás kialakulásának kinetikáját különböző pH értékek esetén. A kimosódáshoz hasonlóan a bemosódási kinetika is lassabb volt alacsony pH esetén a vad-típusú csatornán, pH-független volt a két mutáns esetében, és gyorsabb volt a H399L mutánsnál, mint a H399K mutánsnál. E megfigyelések mind alátámasztották egyszerű modellünket, mely szerint a kötőhely töltődését mindkét irányból akadályozza a pozitív töltésű oldallánc által létrehozott potenciálját a pórus extracelluláris végénél.

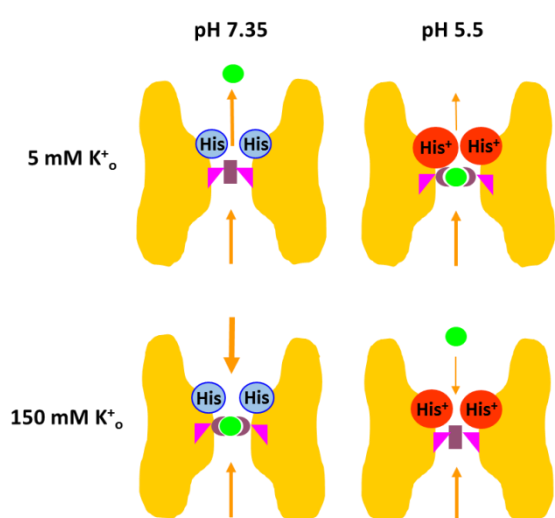


**41. ábra** A  $Ba^{2+}$  gátlás bemosódási kinetikája WT, H399L és H399K mutáns csatornákon

(A-B) Az extracelluláris pH csökkentése lassítja a  $Ba^{2+}$  bemosódási kinetikáját WT  $Kv1.3$  csatornákon. A teljes-sejt áramokat 10 ms hosszú, +70 mV-os depolarizáló impulzusok alatt mértük 15 s időközönként -90 mV tartófeszültségről. A panelek a csúcsáram időbeli változását mutatják 15 mM  $Ba^{2+}$  alkalmazása alatt (fekete csík) pH 7,35 (A) illetve pH 5,5 (B) esetén. A folytonos vonalak az illesztett exponenciális függvényt mutatják, melyek időállandóit meghatároztuk. A bemosódási időállandók függenek a pH-tól a WT csatornánál (C), de függetlenek a H399L és H399K mutánsok esetén (D).

Ezen megfigyelések alapján tehát kibővítettük eredeti modellünket úgy, hogy az alacsony pH-n protonált H399-es aminosav gátolja a  $K^+$  ionok mozgását mindkét irányba a pórus bejáratánál. Emiatt az alacsony pH hatása az inaktivációs kinetikára attól függ, hogy a kötőhely betöltődése elsősorban melyik oldalról történik az áramirány és  $K^+$  koncentráció függvényében.

Összefoglalásképpen, egy egyszerű modellel sikerült megmagyaráznunk a  $Kv1.3$  csatorna szokatlan inaktivációs kinetika változását alacsony extracelluláris pH esetén (42. ábra).



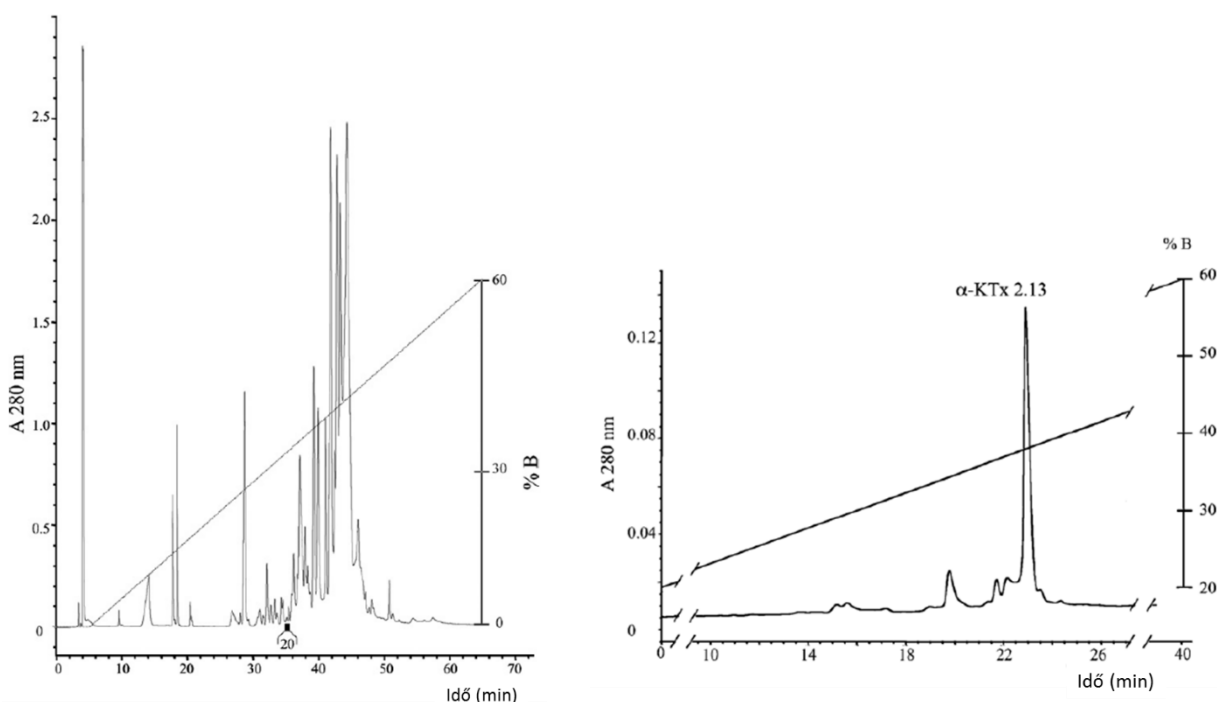
**42. ábra** Modell a H399 szerepéről a  $Kv1.3$  inaktivációjának pH függésében

(Felső panelek) Alacsony extracelluláris  $[K^+]_o$  esetén pH 7,35 mellett a H399 (His) neutrális, míg pH 5,5 mellett protonálódik, így elektromos tere akadályozza a  $K^+$  ion (zöld) kilépését az inaktivációt kontrolláló kötőhelyről (barna), lassítva azt. (Alsó panelek) Magas extracelluláris  $[K^+]_o$  esetén a kötőhely elsősorban kívülről telítődik, így pH 7,35 esetén nagyobb a betöltöttsége, míg a pH 5,5 mellett protonálódott H399 tere akadályozza a  $K^+$  belépését, s így csökkenti a betöltöttséget ezáltal gyorsítva az inaktivációt.

## 5.2 Kv csatornákat gátló skorpió toxinok vizsgálata

### 5.2.1 Új Kv1.3 csatornát gátló peptid toxinok felkutatása és karakterizálása

A skorpió toxinokkal kapcsolatos kutatásaink egy több, mint két évtizedes kollaborációs kapcsolatból származnak Prof. Lourival D Possani munkacsoportjával az Universidad Nacional Autónoma de México egyetemen. Prof. Possani a toxinológia nemzetközileg elismert szaktekinvélye, elsősorban a skorpiómérgek komponenseinek azonosításával és funkciójuk meghatározásával foglalkozik. E kollaboráció révén számos skorpióméregből izolált és általuk meghatározott szerkezetű peptid toxinhoz jutottunk, melyek elektrofiziológiai karakterizálását és  $K_V$  csatornákkal való kölcsönhatásának vizsgálatát laboratóriumunkban végeztük el.



#### 43. ábra A *Centruroides suffusus suffusus* skorpió mérgének reverz-fázisú HPLC kromatogramja

(Bal panel) A *C. s. suffusus* mérgének vízdoldékony részét (melyet 10 mg teljes nyers méregből nyertünk ki) egy reverz-fázisú  $C_{18}$ -as oszloppal frakcionáltuk. Az eluálás 0-60 % acetonitril gradienssel történt 0,1 % TFA (trifluorecetsav) oldatban 60 perc alatt, 2 ml / min áramlási sebességgel. A kis csúcs, melyet a 20-as szám jelöl, volt az a frakció, mely gátló hatást mutatott  $K_{V1.3}$  csatornákon, így azt tovább tisztítottuk. (Jobb panel) A 20-as frakció további tisztítása reverz-fázisú HPLC-vel 20-60%-os acetonitril gradienssel. Az  $\alpha$ -KTx2.13 tiszta peptidet tartalmazó frakció volt az egyetlen, mely gátolta a  $K_{V1.3}$  csatornát. A vízdoldékony méregnek mintegy 0,1%-át teszi ki a peptid.



A bevezetésben említett potenciális terápiás felhasználhatóság reményében keresünk a Kv1.3 csatornát minél hatékonyabban és minél szelektívebben gátló toxinokat. Ezen kívül vizsgáljuk a toxin-csatorna interakció molekuláris részleteit, keressük a kölcsönhatásban szerepet játszó strukturális elemeket. Az évek során munkacsoportunk számos újonnan izolált skorpiótoxin farmakológiai karakterizálását végezte el, mint például a Pi2, Pi3, Ce toxinok, Css20, TsT26, anuroctoxin és a Vm24 (205-210).

Elsőként a toxinok Kv1.3 csatornát gátló hatását teszteltük teljes-sejtes patch-clamp mérésekkel. Esetenként számos peptid keverékét tartalmazó méreg-frakciókat kaptunk mexikói kollaborátorainktól, melyek közül a gátló hatást mutató frakciókat tovább fracionálták kromatográfiás módszerekkel, és végül eljutottunk az izolált egyedi peptidekig, melyek szekvenciáját Edman-degradációval és tömegspektrometriával határozták meg (43. ábra). Más esetekben már korábban izolált, ismert szerkezetű toxinokat kaptunk tesztelésre. A hatékony peptidekkel dózis-hatás görbéket vettünk fel, melynek során a toxint jellemzően 30-100-szoros koncentrációtartományban alkalmazva meghatároztuk a megmaradó Kv1.3 áramhányadokat. A toxint  $[Tx]$  koncentrációban alkalmazva az áram amplitúdója exponenciális kinetikával csökken  $\tau_{in}$  időállandóval az egyensúlyi szintig (44. ábra), melynél a megmaradó áramhányad (Remaining Current Fraction):

$$RCF = \frac{K_d^n}{K_d^n + [Tx]^n}$$

A toxin koncentráció függvényében ábrázolva az RCF-et, az adatpontokra illesztett Hill-függvényekből meghatározhattuk a kötődés mikroszkopikus disszociációs állandóját ( $K_d$ ), valamint a Hill-együtthatót ( $n$ ), melynek egyhez közeli értéke jelezte a toxin-csatorna kölcsönhatás 1:1-es sztöchiometriáját. Ebben az esetben az egyenlet az egyszerű

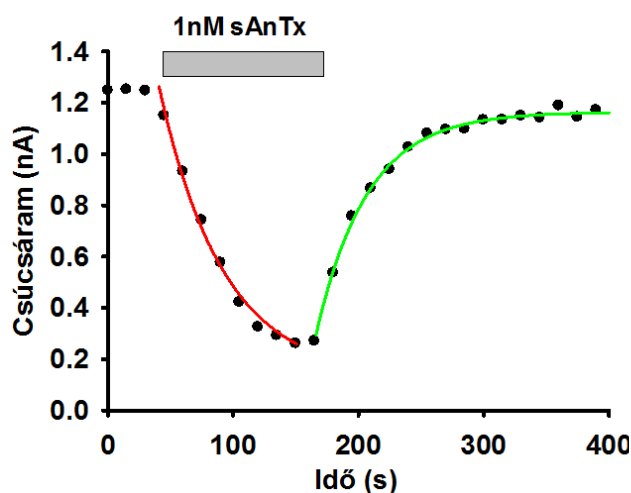
$$RCF = \frac{K_d}{K_d + [Tx]}$$
 formára redukálódik.

Jó gátló hatású toxinok esetén a  $K_d$  értéke néhány nM nagyságrendbe esik, de azonosítottunk néhány igen nagy affinitású peptidet is, melyek  $K_d$  értéke az alacsony pM-os tartományban volt. A gátlás kialakulása során meghatározott  $\tau_{in}$ , és a toxin kimosása során az áram amplitúdó visszatérését jellemző  $\tau_{out}$  időállandók meghatározásával kiszámolhatók a kölcsönhatás sebességi állandói az alábbiak szerint:

$$k_{ON} = \frac{1 - \tau_{ON} \times k_{OFF}}{\tau_{ON} \times [Tx]} \quad k_{OFF} = \frac{1}{\tau_{OFF}}$$

A mikroszkópikus asszociációs ( $k_{ON}$ ) és disszociációs ( $k_{OFF}$ ) sebességi állandókból szintén kiszámolható a dózis-hatás görbéből is kinyert disszociációs állandó:

$$K_d = \frac{k_{OFF}}{k_{ON}}$$



#### 44. ábra A toxin disszociációs állandójának meghatározása a be- és kimosódási kinetikákból

A toxin alkalmazása során (szürke csík) az áramamplitúdó időben exponenciálisan csökken (illesztés pirossal)  $\tau_{ON}$  időállandóval, mely függ a toxin koncentrációjától, majd kimosás során szintén exponenciális időfüggéssel tér vissza (zöld illesztés)  $\tau_{OFF}$  időállandóval koncentrációtól függetlenül. A disszociációs állandó a szövegben leírt módon számolható a két időállandóból és a toxin koncentrációból.

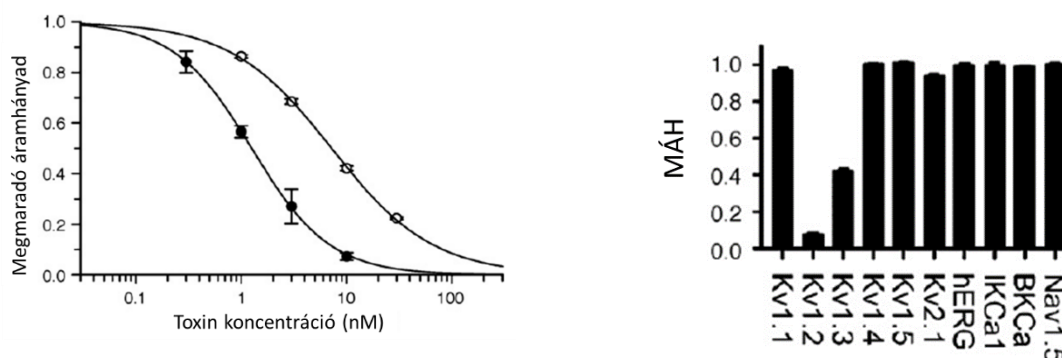
A  $K_v1.3$  csatorna iránti affinitás meghatározását követően elvégezzük a toxinok biofizikai jellemzését: vizsgáljuk az asszociációs és disszociációs kinetikát, a gátlás feszültség-függését, esetenként kompetíciós kísérletekkel a kötőhely pozícióját, illetve néhány toxinnál végeztünk dokkolási szimulációkat a csatornával kölcsönható aminosavak meghatározására. Végül pedig a szelektivitás meghatározása történik a toxint kipróbálva a rendelkezésünkre álló, mintegy 15 ioncsatornából álló bankunkon. A nagy szelektivitás igen fontos elvárás egy potenciálisan gyógyszerként használandó molekulánál a mellékhatásokat okozó keresztreakciók elkerülése szempontjából. A skorpió toxinok esetében a szelektivitás általánosan elfogadott kritériuma a százszoros különbség a toxin disszociációs állandójában két  $K^+$  csatorna között (211), de karakterizáltunk ennél lényegesen nagyobb szelektivitást mutató toxinokat is.

A hagyományos vizsgálatokon túl bizonyos toxinoknál végeztünk további kísérleteket a struktúra-funkció kapcsolat feltárására is. A nem-diffúzió-limitált bimolekuláris toxin-csatorna modell szerint (212, 213) a toxin és a csatorna kölcsönhatásának első lépéseként kialakul egy „kölcsönhatási komplex”, mely a toxin diffúzióját jelenti a csatorna közelébe, és nagyszámú

kapcsolódási orientáció „kipróbálását”, melyek még nem jelentik a pórus, azaz az ionáram blokkolását. Ez a lépés a hosszú távú nem-specifikus elektrosztatikus kölcsönhatásoktól függ, ami a nettó pozitív töltésű toxin és a negatív töltésű szelektivitási szűrő között lép fel. A lokális negatív felszíni potenciál megnöveli a toxin koncentrációját a pórus közelében és magas asszociációs sebességi állandót eredményez. Innen alakulhat ki a már a pórus blokkolásával járó kötött állapot. Ezt a lépést ma már a hagyományos merev „kulcs a zárban” modell helyett egy, mindkét molekula részéről rugalmasabb átalakulást feltételező „kéz és kesztyű” vagy „induced fit”, azaz indukált illeszkedésként képzeljük el (214). Ez a sebesség-meghatározó lépés magában foglalja az aminosav oldalláncok átrendeződését, hidrogénkötések kialakítását, és a kationok és vízmolekulák kiszorítását az érintkező felületek közül. Ennél a lépésnél már a rövidtávú, a két molekula aminosav oldalláncai közötti páronkénti elektrosztatikus kölcsönhatások játszanak szerepet. A kötődés affinitását a szoros kontaktust kialakító aminosav párok között kialakuló elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatások, illetve hidrogénkötések száma határozza meg, ami a két kölcsönható felszín komplementaritásának mértékétől függ. A toxin-csatorna komplex átlagos élettideje, és így a disszociáció sebessége ( $k_{\text{OFF}}$ ) e kölcsönhatásoktól függ. Így a gátlás kialakulásának és az abból való visszatérésnek a sebességét mérve, és abból az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat meghatározva többlet információ nyerhető a kölcsönhatás mechanizmusáról.

#### 5.2.1.1 A *Css20* skorpiótoxin szelektivitást meghatározó tulajdonságainak vizsgálata

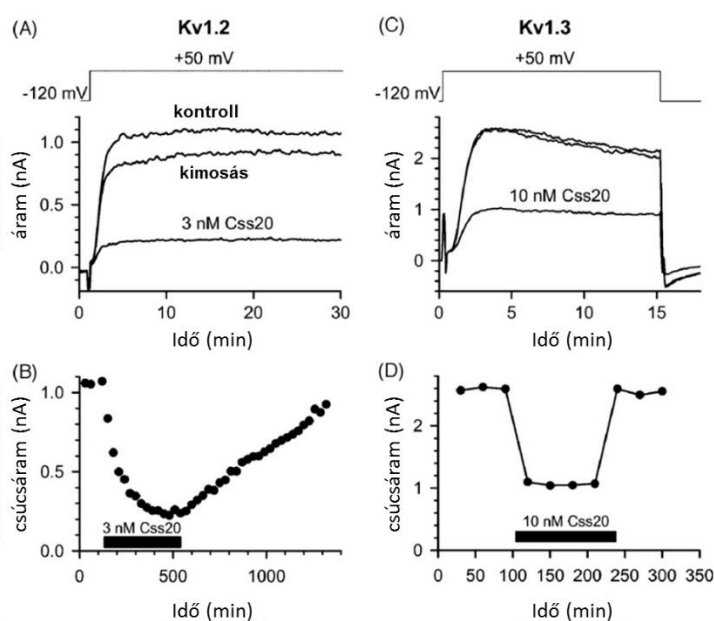
Ilyen jellegű részletesebb tanulmányunk a *Centruroides suffusus suffusus* skorpió mérgéből izolált *Css20* nevű toxin gátlási mechanizmusának analízise volt. Ez a peptid méréseink szerint gátolta a  $K_v1.2$  ( $K_d = 1,5$  nM) és a  $K_v1.3$  csatornákat ( $K_d = 7,2$  nM), míg nyolc másik tesztelt csatornán, köztük a közeli rokon  $K_v1.1$  és  $K_v1.4$  csatornákon hatástalannak bizonyult (207) (45. ábra).



#### 45. ábra A *Css20* toxin affinitása és szelektivitása

(Bal panel) A *Css20* dózis-hatás görbéje  $K_v1.2$  (tele körök) és  $K_v1.3$  (üres körök) csatornákon. A megmaradó áramhányadot  $MÁH = I/I_0$  alapján határoztuk meg, ahol  $I_0$  a kontroll oldatban mért áramamplitúdó, míg  $I$  a toxin adott koncentrációja mellett, az egyensúlyi gátlás beállását követően mért áramamplitúdó. A mért pontokat Hill egyenlettel illesztettük:  $MÁH = K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$ , ahol  $[Tx]$  a toxin koncentráció,  $K_d$  a disszociációs állandó, és  $n$  a Hill koefficiens. (Jobb panel) A *Css20* szelektivitásának vizsgálata. A teljes-sejt áram megmaradó hányadát 10 nM toxin koncentráció mellett határoztuk meg. A  $K_v1.2$  és  $K_v1.3$  csatornákon kívül egyik csatornát sem gátolta szignifikáns mértékben a *Css20*.

Érdekes módon a gátlás kialakulásának és az abból való visszatérésnek a kinetikája lényegesen lassabb volt a hatékonyabban gátolt  $K_v1.2$  csatornán a  $K_v1.3$ -hoz képest, ami arra utal, hogy a két csatornával más módon hat kölcsön a toxin (46. ábra). Ennek felderítéséhez molekuláris dokkolási szimulációkat végeztünk, melyekkel az egyes csatornákhöz történő kötődés affinitását és szelektivitását meghatározó kritikus aminosavakat kívántuk meghatározni. Ez az információ segítséget nyújthat olyan módosítások tervezéséhez, mellyel egy adott csatornára specifikus toxin hozható létre. Ezt a stratégiát alkalmaztuk egy szelektív anurotoxin mutáns létrehozásánál (ld. alább).



#### 46. ábra A *Css20* gátlás reverzibilitása és kinetikája

A *Css20* reverzibilisen gátolja a  $hK_v1.2$  (A) és  $hK_v1.3$  (C) áramokat, melyeket +50 mV-os depolarizáló impulzusokkal váltottunk ki -120 mV-os tartófeszültségről 30 s-os időközönként. A  $K_v1.2$  csatornákat Cos-7 sejteken, a  $K_v1.3$  csatornákat humán limfocitákon mértük. Az áramamplitúdók változása a toxin be- és kimosása során  $K_v1.2$  (B), illetve  $K_v1.3$  csatornákon (D). A toxin alkalmazásának időtartamát az időskála feletti fekete csík jelzi. A  $K_v1.2$  csatornán mind a be-, mind a kimosódás kinetikája lényegesen lassabb volt, mint a  $K_v1.3$  csatorna esetén.

Az  $\alpha$ -KTx2 családba tartozó toxinok szekvenciájának összehasonlítása számos igen konzervált aminosavat mutat, melyek közül kettő, a kritikus lizin (K28 a Csx20-ban) és egy aromás aminosav 9 pozícióval lejjebb (Y37) alkotja a bevezetőben már említett, „esszenciális diádnak” nevezett, sok nagy affinitású  $K^+$  csatorna gátló toxinban megtalálható párost (157, 158, 215, 216). Az esszenciális diád kritikusnak tűnik a  $K_v1.2$  nagy affinitású gátlásához. A diád aminosavainak alaninra történő mutációja több nagyságrenddel csökkentette a Pi1 toxin ( $\alpha$ -KTx 6.1) affinitását a  $K_v1.2$  iránt (217), és e két pozíció szintén kritikusnak bizonyult a maurotoxinban (MTX ( $\alpha$ -KTx 6.2), K23 és Y32) a  $K_v1.2$ -höz történő kötődésben (218). A diád szükségessége azonban nem ennyire egyértelmű a  $K_v1.3$  gátlása esetén. A diád jelenléte ellenére a MTX igen gyengén gátolja a  $K_v1.3$ -at, de a csatorna pórus külső végénél található H399T mutáció a  $K_v1.2$ -höz hasonló érzékenységet kölcsönöz a  $K_v1.3$ -nak. Az MTX Y32 diád aminosaváról kimutatták, hogy kölcsönhat a mutáns  $K_v1.3$  T399-es aminosavával, így a vad-típusú  $K_v1.3$  csatorna 399-es pozíciójú hisztidinje és a toxin diád tirozinja közötti kölcsönhatás valószínűleg akadályozza a nagy affinitású kötődést. Ugyanez állhat fent a Csx20 esetén, mivel a dokkolási szimulációink kölcsönhatást mutatnak a toxin Y37-es és a  $K_v1.3$  H399-es aminosava között. Annak ellenére, hogy több olyan toxin is ismert, melyben tirozin található az aromás diád pozícióban és nM-os koncentrációban gátolja a  $K_v1.3$ -at, mint pl. a noxiustoxin, hongotoxin-1 és a Csx20, a  $K_v1.3$  iránti szelektivitás szempontjából előnyösebbnek tűnik más egyéb aminosavak jelenléte a tirozin helyett. A  $K_v1.3$ -at leghatékonyabban gátló skorpió toxinokban az „aromás diád” pozícióban tirozintól különböző aminosavak találhatók: fenilalanin (Pi2, Pi3, és anuroctoxin azaz  $\alpha$ -KTx 7.1, 7.2 és 6.12) (205, 209), treonin (kaliotoxin és OSK1 azaz  $\alpha$ -KTx 3.1 és 3.7) (219, 220), vagy aszparagin (HsTx1 azaz  $\alpha$ -KTx 6.3) (221), míg az összes  $K_v1.2$ -t „preferáló” toxinban tirozin található ebben a pozícióban (MTX, Pi1, CoTX1 ( $\alpha$ -KTx 10.1), Pi4 ( $\alpha$ -KTx 6.4), (222-225), 1. táblázat).

## Feszültség-függő ioncsatornák kapuzása és kölcsönhatása skorpió toxinokkal

		peptid																				töltés / His		K <sub>d</sub> arány		K <sub>d</sub> (nM)																			
név		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	össz/ C-term	Kv1.2 / K1.3	Kv1.2	Kv1.3																				
Kv1.2	maurotoxin	V	S	C	T	G	S	K	D	C	Y	A	P	C	R	K	T	G	C	P	N	A	-	K	C	I	N	K	S	C	K	C	Y	G	C	5/0	3/0	2e-4	0.7 <sup>a</sup>	3300 <sup>a</sup>					
	CoTX1	A	V	C	V	Y	R	T	-	C	D	K	D	C	K	R	R	E	G	Y	R	S	G	-	K	C	I	N	N	A	C	K	C	Y	P	Y	6/0	3/0	0.005	27 <sup>b</sup>	5300 <sup>b</sup>				
	Pi4	I	E	A	I	R	C	G	S	R	D	C	Y	R	P	C	K	R	E	T	G	C	P	N	A	-	K	C	I	N	K	T	C	K	C	Y	G	C	S	6/0	3/0	<8e-7	0.008 <sup>c</sup>	>10000 <sup>c</sup>	
	Pi1	L	V	K	C	R	G	T	S	D	C	G	R	P	C	Q	Q	C	T	G	C	P	N	S	-	K	C	I	N	R	M	C	K	C	Y	G	C	5/0	3/0	0.09	1 <sup>d</sup>	11 <sup>e</sup>			
	Css20-3	I	F	I	N	V	K	C	S	S	P	Q	Q	C	L	K	P	C	K	A	F	G	I	S	A	G	G	K	C	I	N	G	K	C	K	C	Y	P	6/0	3/0	0.2	1.5	7.2		
átmeneti	Noxiustoxin	T	I	I	N	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	S	K	P	C	K	E	L	Y	G	S	S	A	G	A	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	N	N	6/0	3/0	2	2 <sup>f</sup>	1 <sup>f</sup>
	Hongotoxin-1	T	V	I	D	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	L	P	P	C	K	A	F	G	I	R	A	G	A	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	P	H	6/1	4/1	1.9	0.17 <sup>g</sup>	0.09 <sup>g</sup>	
	ChTX	E	F	T	N	V	S	C	T	T	S	K	E	C	W	S	V	C	Q	R	I	H	N	T	S	R	G	-	K	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S	5/1	5/1	5.4	14 <sup>f</sup>	2.6 <sup>f</sup>	
Kv1.3	anurotoxin	Z	K	E	C	T	G	P	Q	H	C	T	N	F	C	R	K	N	E	-	K	C	T	H	G	-	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	N	C	K	7/2	6/1	9	6 <sup>h</sup>	0.7 <sup>h</sup>	
	OSK1	G	V	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	8/1	4/1	386	5.4 <sup>i</sup>	0.014 <sup>i</sup>
	OSK1-20	G	V	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	6/1	4/1	2108	78 <sup>i</sup>	0.037 <sup>i</sup>
	OSK1-12,16,20	G	V	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	7/1	4/1	3322	196 <sup>j</sup>	0.059 <sup>j</sup>
	HsTX1	A	S	C	R	T	P	K	D	C	A	D	P	C	R	K	E	T	G	C	P	Y	G	-	K	C	M	N	R	K	C	K	C	N	R	C	6/0	5/0	>45000	>500 <sup>j</sup>	0.011 <sup>j</sup>				
	KTX	G	V	E	I	N	V	K	C	S	G	S	P	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	R	K	C	H	C	T	P	K	6/1	5/1	>1538	>1000 <sup>f</sup>

diád

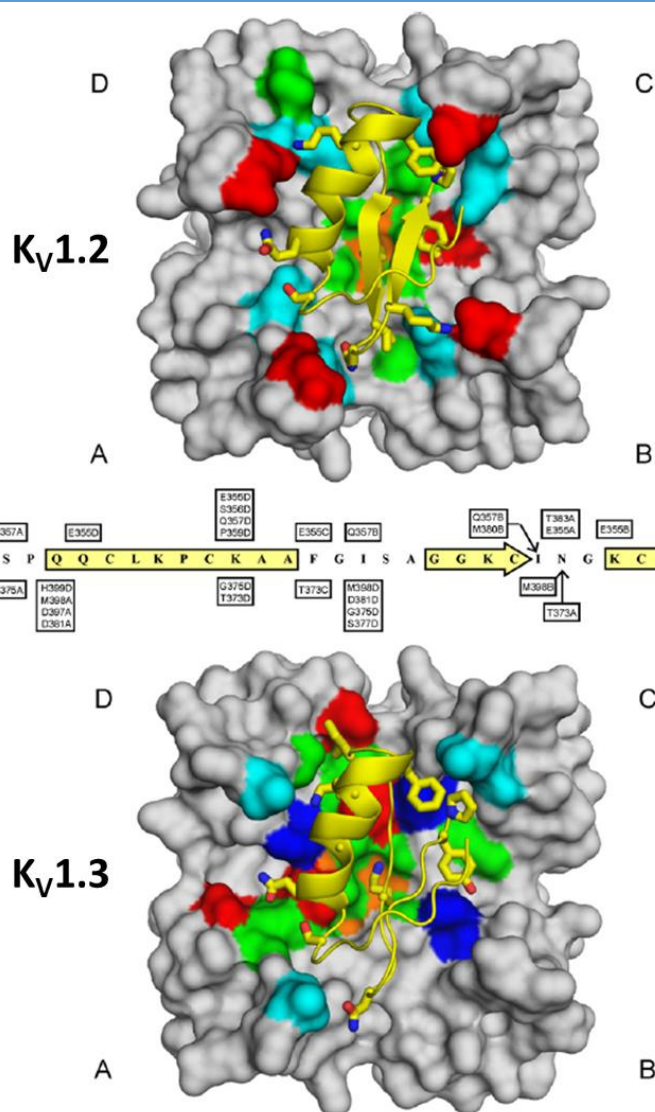
diád

**1. táblázat Kv1.2 és Kv1.3 gátló toxinok szekvenciája és szelektivitása**

A táblázatban olyan  $\alpha$ -KTx toxinok találhatók melyeknek ismert az affinitása mindkét csatorna iránt. A szekvenciákat a diszulfid hidakat kialakító ciszteinek alapján rendeztük össze. A következő oszlop a toxinban található összes nettó töltést jelzi az aminosav oldalláncok töltése alapján, illetve a protonálható hisztidinek számát, míg az azt követő oszlop ugyanezeket mutatja a (szaggatott vonaltól jobbra található) C-terminális régióban. A következő oszlopban a közölt értékekből számolt K<sub>d</sub> arány található, mely alapján Kv1.2-szelektív, átmeneti, vagy Kv1.3-szelektív csoportba soroltuk a toxinokat. Az utolsó két oszlop a közölt K<sub>d</sub> értékeket mutatja a két csatornára. A bekeretezett pozíciókban jellegzetes mintázatok figyelhetők meg a különböző szelektivitású toxinokban az aminosavak karakterét illetően. A táblázat alatt az „esszenciális diád” két pozícióját jelöltük.

Tehát míg a pórusba benyúló kritikus lizin esszenciálisnak tűnik mindkét csatorna gátlásához, úgy tűnik, hogy a diád másik felét alkotó tirozin a Kv1.2 irányába módosítja a szelektivitást. Ezzel megegyezően a dokkolási eredmények több kontaktust is mutatnak a Css20 Y37 és P38 aminosavai és mindkét csatorna felszíni aminosavai között, ami arra utal, hogy az „aromás diád” pozícióban levő aminosav nagyon fontos meghatározója a nagy affinitású gátlásnak szterikus korlátok révén (47. ábra).





#### 47. ábra A C<sub>ss</sub>20 K<sub>v</sub>1.2 és K<sub>v</sub>1.3 csatornákhöz történő kötődésének modellje

A toxin dokkolása a K<sub>v</sub>1.2 (fent) és K<sub>v</sub>1.3 (lent) csatornákhöz. A toxint sárgával megjelenített másodlagos szerkezeti elemek mutatják, míg a csatornákat molekuláris felszínekként ábrázoltuk. A toxin csatornával kontaktusba lépő oldalláncait pálcika ábrázolással jelöltük, melyekben a N atomok kék, az O atomok piros színt kaptak. A csatorna toxinnal kontaktusba lépő aminosavait a következők szerint színeztük: savas (Asp, Glu) piros, bázikus (Arg, His, Lys) kék, poláros (Asn, Gln, Ser, Thr) világoskék, hidrofób (Gly, Met, Pro, Val) zöld, és aromás (Tyr) narancs. A középső panel a toxin szekvenciáját mutatja a 9-es pozíciótól (ennél előrébb nincs jelentős kontaktus), a sárga részek a másodlagos szerkezeti elemeket jelölik. Az egyes aminosavak felett a K<sub>v</sub>1.2, alatt a K<sub>v</sub>1.3 az azzal kölcsönható csatorna aminosavak vannak feltüntetve. Az utolsó betű (A-D) a csatorna alegységet jelöli, melyben a kölcsönható aminosav található. Például a toxin S9 kölcsönhat a K<sub>v</sub>1.2-ben a Q357 aminosavval az A alegységben.

A toxin különböző régióinak szerepét a csatorna felismerésében egy kiméra toxinnal demonstrálták, melyet a K<sub>v</sub>1.2-szelektív MTX  $\alpha$ -helikális N-terminális szakaszából, és a K<sub>v</sub>1.3-szelektív HsTx1 C-terminális szakaszából állítottak össze (a két szakasz határát szaggatott vonal jelzi az 1. táblázatban) (226). Kimutatták, hogy az MTX  $\beta$ -lemezt tartalmazó C-terminális felét a HsTx1 megfelelő szakaszával helyettesítve teljesen megszűnt a K<sub>v</sub>1.2 nagy affinitású gátlása, ami e szakasznak a szelektivitás meghatározásában játszott szerepére utal. E régió közelebbi vizsgálata különbségeket tár fel a K<sub>v</sub>1.2- és K<sub>v</sub>1.3-specifikus toxinok között a bázikus és savas oldalláncú aminosavak számát tekintve (Table 3). A K<sub>v</sub>1.3 iránt nagyobb affinitást mutató



toxinok jellemzően nagyobb nettó töltéssel rendelkeznek, de még lényegesebb, hogy a toxin C-terminális felének magasabb nettó töltése jól korrelál a Kv1.3 iránti szelektivitással a Kv1.2-vel szemben. A Css20 illeszkedik ebbe mintába, mivel csak három bázikus aminosava van (a diád lizin, és két másik lizin) a C-terminális félen, és nagyobb affinitással bír a Kv1.2 irányába. Továbbá a Css20 dokkolási szimulációja a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákhöz a nem-diád lizinek (K33 és K35) által kialakított hidrogén hidat és több egyéb kontaktust mutat a Kv1.2-vel, de egyet sem Kv1.3-mal.

A szelektivitás szempontjából fontos lehet továbbá a kritikus lizintől két pozícióval lejjebb található aminosav (keretezve az 1. táblázatban), mivel annak ismeretében, hogy a lizin oldallánca behatol a szelektivitási szűrőbe, várhatóan ez az aminosav is közeli kapcsolatba kerül a csatorna felszínével. A szekvenciák összehasonlításából kiderül, hogy a nagy affinitású Kv1.2 gátlókban ebben a pozícióban egy izoleucin, míg a Kv1.3-szelektív toxinokban egy metionin található. Ezt az izoleucint azonosították is, mint kulcsfontosságú aminosavat a CoTx1 (224) és Pi4 (225) toxinok Kv1.2-vel történő kölcsönhatásában. A Css20-ban e pozícióban izoleucin van (I30), ami megfelel a Kv1.2-szelektív toxinok mintázatának, és dokkolási eredményeink is megerősítik, hogy ez az aminosav valóban közelebb van a csatorna felszínéhez a Kv1.2 esetén (kb. 2 Å) mint Kv1.3 esetén (kb. 5 Å).

A toxinok  $\alpha$ -helikális részt tartalmazó N-terminális szegmensei nem mutatnak olyan nyilvánvaló különbségeket, melyek felelősek lehetnének a szelektivitás meghatározásáért bármelyik csatorna irányába. Ennek ellenére az MTX-HsTx1 kiméra kísérletek világosan demonstrálják ennek a szakasznak a fontos szerepét is a kötődés során. A HsTx1 N-terminális felét kicserélve a MTX megfelelő szakaszára, közel 400-szoros faktorral csökkent a toxin Kv1.3 iránti affinitása (226). Amikor az OSK1 toxin három aminosavát mutálták (OSK1-12,16,20, az 1. táblázatban jelölve) a nagy Kv1.3-szelektivitású kalitoxin ekvivalens pozícióiban található aminosavakra, a Kv1.3 iránti szelektivitás mintegy tízszeresére nőtt (220). Az OSK-1 K20D mutációja önmagában mintegy hétszeres javulást okozott a Kv1.3 iránti szelektivitásban, valamint a CoTx1 ekvivalens R14 aminosaváról kimutatták, hogy kölcsönhat a Kv1.2-vel. E megfigyelések arra utalnak, hogy ebben a pozícióban a bázikus aminosavak a Kv1.2-höz való kötődést segítik elő a Kv1.3-hoz képest (224).

A Pi4 toxin R19 aminosava is fontos meghatározója a Kv1.2-höz történő kötődésnek. A

Kv1.2-szelektív toxinokban arginin vagy glutamin található ebben a pozícióban, míg a csatornát kisebb affinitással gátló toxinokban rövidebb oldalláncú töltetlen vagy savas aminosavak találhatók (225). Ebből a szempontból a Css20 különbözik a nagy affinitású Kv1.2 gátló toxinoktól, mivel két alanin található az ekvivalens pozíciókban (19 és 20). A felsorolt kritériumok alapján a C-terminális fél alacsony nettó töltése, a diád tirozin jelenléte (Y37) és a 30-as pozíciójú izoleucin nagy affinitást jósolnak a Kv1.2 felé, míg az alaninek a 19-es és 20-as pozíciókban valószínűleg ezzel ellentétesen hatnak. Ezek eredőjeként a Css20 kis mértékben szelektív a Kv1.2 irányában a Kv1.3-mal szemben azaz közepes szelektivitású toxinnak tekinthető.

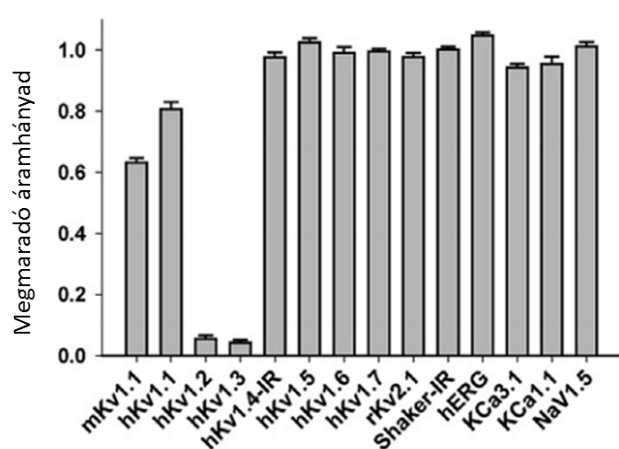
Mind a gátlási egyensúly kialakulása, mind az áramamplitúdó gátlásból való visszatérése teljes volt 30 másodpercen belül a Kv1.3 esetén, míg a gátlás kialakulása mintegy 10-szer, a gátlásból való visszatérés pedig 30-szor lassabb volt Kv1.2 esetén. A lényeges különbségek a toxin asszociációs és disszociációs sebességi állandóiban különböző kölcsönhatásokra utalnak a két csatornával a hasonló affinitás ellenére. A Kv1.3-hoz történő gyors asszociáció gyors orientációra utal a dokkolás korai lépései során hosszú-távú elektrosztatikus kölcsönhatások révén, de számos szoros kontaktusból származó kedvezőtlen kölcsönhatás okoz hasonlóan gyors disszociációt a csatornától (151). A dokkolási eredmények teljes mértékben alátámasztják ezt a modellt; a legtöbb toxinnal kölcsönható aminosav a Kv1.3 szelektivitási szűrőjénél található, melyek főleg a toxin pórusba nyúló K28 aminosavával lépnek kölcsönhatásba. Ezzel szemben a Kv1.2 esetén úgy tűnik, kevésbé érvényesül a hosszú-távú elektrosztatikus kölcsönhatások orientáló hatása, így lassabb az asszociáció. A Css20 kontakt felszíne azonban jobban illeszkedik a Kv1.2 dokkolási felszínéhez, és a modellezés által jósolt kiterjedt hidrogénkötés hálózaton keresztül kötődést követően hosszabb ideig marad kapcsolatban a csatornával, ami lassabb disszociációt és magasabb affinitást eredményez.

#### *5.2.1.2 A margatoxin szelektivitásának vizsgálata*

Ezen toxinokon felül részletesen vizsgáltuk a korábban izolált, sokak által a Kv1.3 csatorna szelektív gátlószereként ismert és alkalmazott margatoxin (227, 228) hatását 13 különböző ioncsatornán. Annak ellenére, hogy a margatoxin a káliumcsatornák vizsgálatában széles körben használt, kereskedelmi forgalomban lévő molekula, olyan tanulmány, mely azonos feltételek mellett (expressziós rendszer, affinitás meghatározásának módja, stb.)

keletkezett adatok alapján adna felvilágosítást a margatoxin receptorára, még nem ismert. Egy ilyen átfogó tanulmány hiányában több munkacsoport, mely e toxint alkalmazta eszközként, téves következtetéseket vonhatott le különböző sejttypusok által kifejezett ioncsatornák meghatározása során.

E tanulmányban megállapítottuk, hogy a margatoxin hatékonyabban gátolja a  $K_v1.2$  csatornát, mint a  $K_v1.3$ -at, és bár lényegesen kisebb affinitással, de a  $K_v1.1$  csatornát is (48. ábra). Így a konklúzióink szerint a margatoxin nem tekinthető  $K_v1.3$ -szelektív gátlószernek (229).



**48. ábra A margatoxin (MgTx) szelektivitása**

A MgTx gátló hatását vizsgáltuk 14 ioncsatornán outside-out konfigurációban. Az ábrán a megmaradó áramhányadot ábrázoltuk 1 nM toxin jelenlétében a kontrollhoz képest. Az egyes csatornához használt expressziós rendszerek és feszültség-protokollok a Módszerek leírásánál találhatók meg. Az eredmények alapján az irodalomban sokak által  $K_v1.3$ -szelektív toxinként kezelt MgTx hasonló hatékonysággal gátolja a  $K_v1.2$  csatornát, és bár kisebb affinitással, de a  $K_v1.1$  csatornát is.

#### 5.2.1.3 Egy kivételes tulajdonságokkal rendelkező skorpiótoxin, a Vm24

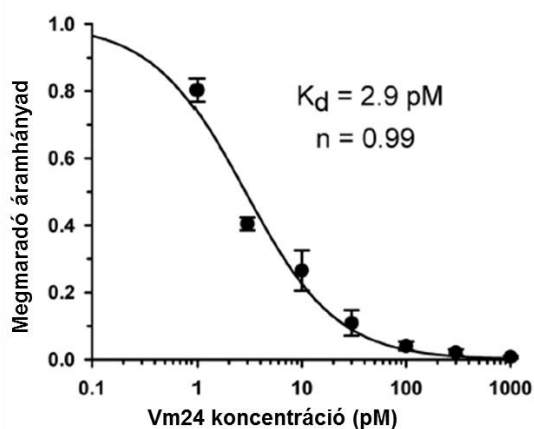
Az eddig felsorolt toxinok közül több hatékony ( $K_d$  a nM vagy alacsonyabb koncentráció tartományban), és többé-kevésbé szelektív gátlószer a  $K_v1.3$  csatornának. Itt a legjobb tulajdonságú Vm24 toxint mutatom be (210).

A Vm24 egy 36 aminosavból álló toxin, mely a *Vaejovis mexicanus smithi* skorpió mérgéből származik. Szekvenciája az 49. ábrán látható, szerkezetét négy diszulfid híd stabilizálja, és megtalálható benne a fent ismertetett „esszenciális diád”, melyet az egyik  $\beta$ -lemezből kinyúló Lys25 oldallánca, és a Tyr34 hoz létre.



**49. ábra A Vm24 toxin szekvenciája és szerkezete**

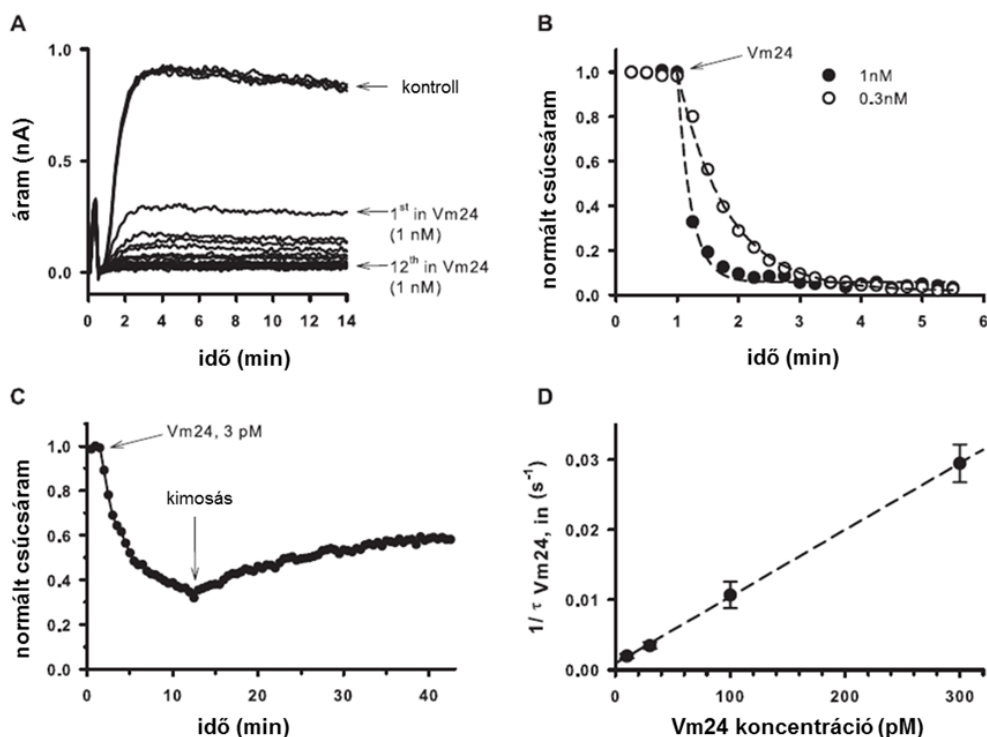
A Vm24 szerkezetét négy, a fekete vonalakkal jelzett diszulfid híd stabilizálja, a zöld rész a rövid  $\alpha$ -hélixet, a pirosak a  $\beta$ -redőket a jelölik. A kék vonal az „esszenciális diád” két aminosavát jelzi.



**50. ábra A Vm24 dózis-hatás görbéje a Kv1.3 csatornán**

A Vm24 hatását Kv1.3 csatornákat expresszáló humán limfocitákon mértük. A megmaradó áramhányadot  $MÁH = I/I_0$  alapján határoztuk meg, ahol  $I_0$  a kontroll oldatban mért áramamplitúdó, míg  $I$  a toxin adott koncentrációja mellett, az egyensúlyi gátlás beállását követően mért áramamplitúdó. A mért pontokat Hill egyenlettel illesztettük:  $MÁH = K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$ , ahol  $[Tx]$  a toxin koncentráció,  $K_d$  a disszociációs állandó, és  $n$  a Hill koefficiens. Az illesztés  $K_d = 2,9$  pM és  $n = 0,99$  értékeket adott.

Méréseink szerint a Vm24 a jelenleg ismert egyik legpotensebb Kv1.3 csatorna gátlószer, disszociációs állandója 2,9 pM (50. ábra). A nagyon alacsony alkalmazott koncentrációk és a rendkívül lassú kimosódási kinetika miatt több kísérletet végeztünk annak megerősítésére, hogy a csatornával fellépő valódi specifikus kölcsönhatás révén alakul ki a gátlás.

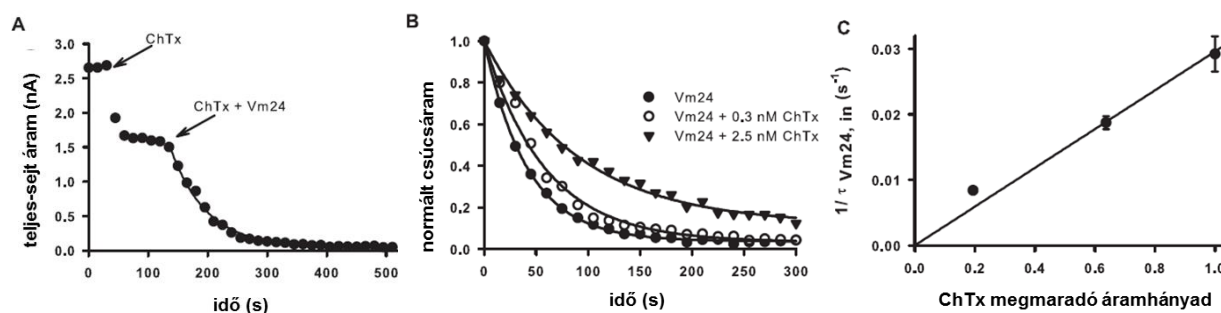


**51. ábra A Kv1.3 csatornák gátlása a Vm24 által**

A teljes-sejt áramokat a Kv1.3 csatornákon keresztül humán limfocitákban váltottuk ki +50 mV-os depolarizáló impulzusokkal -120 mV-os tartófeszültségről 15 s időközönként. 1 nM Vm24 szinte teljes mértékben gátolta az áramot. Nyílak jelzik az első és a 12. impulzust a toxin jelenlétében. (B) Normált csúcsáramok az idő függvényében 0,3 vagy 1 nM Vm24 alkalmazása során. A nyíl jelzi a toxin hozzáadásának idejét. (C) Normált csúcsáramok az idő függvényében 3 pM Vm24 alkalmazása, majd a toxin kimosása során. A toxin-mentes kontroll oldattal való perfúzió az áram nagyon lassú részleges visszatérését okozta ~ 3800 s-os időállandóval. Az impulzusok 30 s időközönként követték egymást. (D) A gátlás kialakulásának sebessége (a bemosási időállandó reciproka,  $1/\tau_{Vm24,in}$ ) a Vm24 koncentráció függvényében. A pontokat egyenlővel illesztettük ( $r^2 = 0,99$ ).

Vizsgáltuk a gátlás kialakulásának kinetikáját az alkalmazott koncentráció függvényében, és a vártak megfelelően, a bemosási időállandó reciproka egyenesen arányos volt a koncentrációval. Ennek magyarázata, hogy a bemosási időállandó  $\tau_{Vm24,in} = 1 / ((k_{ON} \times [Vm24] + k_{OFF}))$ , ahol  $k_{ON}$  és  $k_{OFF}$  a toxin asszociáció és disszociáció molekuláris sebességi állandói és  $[Vm24]$  a toxin koncentrációja, de a toxin nagyon lassú kimosódása miatt  $k_{OFF} \approx 0$ , így  $\tau_{Vm24,in} = 1 / (k_{ON} \times [Vm24])$  adódik (51. ábra).

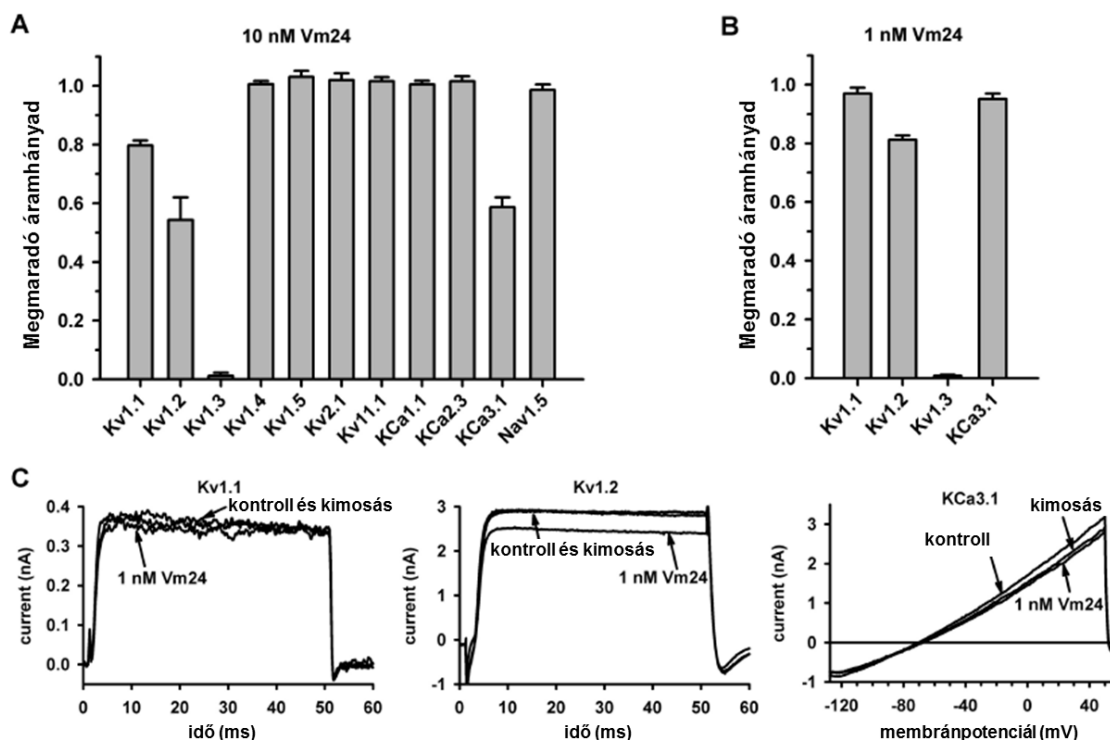
Végeztünk kompetíciós kísérletet charybdotoxinnal (ChTx), mely egy jól karakterizált pórus-blokkolója e csatornának, és azt tapasztaltuk, hogy növekvő ChTx koncentrációk mellett lassult a Vm24 bemosódási kinetikája, mely arra utalt, hogy azonos kötőhelyért kompetálnak, azaz a Vm24 is a hagyományos toxin gátlási mechanizmust követi (52. ábra).



## 52. ábra Kompetíció a ChTx és a Vm24 között

(A)  $K_v1.3$  csúcsáramok az idő függvényében egy T sejten, melyet először 0,3 nM ChTx-nal, majd az egyensúly beálltát követően 0,3 nM ChTx és 0,3 nM Vm24 keverékével perfundáltunk. A Vm24 gátlás kinetikáját egy-exponenciális illesztés időállandójával jellemeztük. (B) T sejtek normált csúcsáramai, melyek 0,3 nM Vm24 gátlási kinetikáját mutatják ChTx nélkül, vagy 0,3 nM vagy 2,5 nM ChTx jelenlétében. (C) A 0,3 nM Vm24 gátlás sebessége (a bemosási időállandó reciproka) a ChTx jelenlétében vagy hiányában megmaradó áramhányad (nem gátolt csatorna hányad) függvényében. A pontokat egyenessel illesztettük ( $r^2 = 0,967$ ).

Egy ilyen affinitású toxinnal különösen érdekes a csatorna-szelektivitás, ezért 10 egyéb ioncsatornán is teszteltük gátló képességét. 10 nM koncentrációban három csatornán okozott jelentősebb gátlást, azonban 1 nM koncentrációban már csak a  $K_v1.2$  csatornát gátolta mintegy 20 %-ban. Ez legalább 1500-szoros szelektivitást jelent a  $K_v1.3$  irányába, ami bőven meghaladja a terápiás alkalmazáshoz javasolt minimum 100-szoros különbséget (53. ábra).



### 53. ábra A Vm24 szelektivitása

(A) A Vm24 gátló hatását vizsgáltuk 11 ioncsatornán. Az ábrán a megmaradó áramhányadot ábrázoltuk 10 nM toxin jelenlétében a kontrollhoz képest. Az egyes csatornákhöz használt expressziós rendszerek és feszültség-protokollok a Módszerek leírásánál találhatók meg. (B) Azoknál a csatornáknál, melyeknél 10 nM toxin jelenlétében detektálható gátlást tapasztaltunk, újra meghatároztuk a megmaradó áramhányadokat 1 nM toxin jelenlétében. (C) 1 nM Vm24 hatása  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$  és  $K_{Ca}3.1$  csatornákra. Az áramgörbéket toxin alkalmazás előtt (kontroll), a gátlási egyensúly beállta után (1 nM Vm24), és kimosást követően (kimosás) rögzítettük.

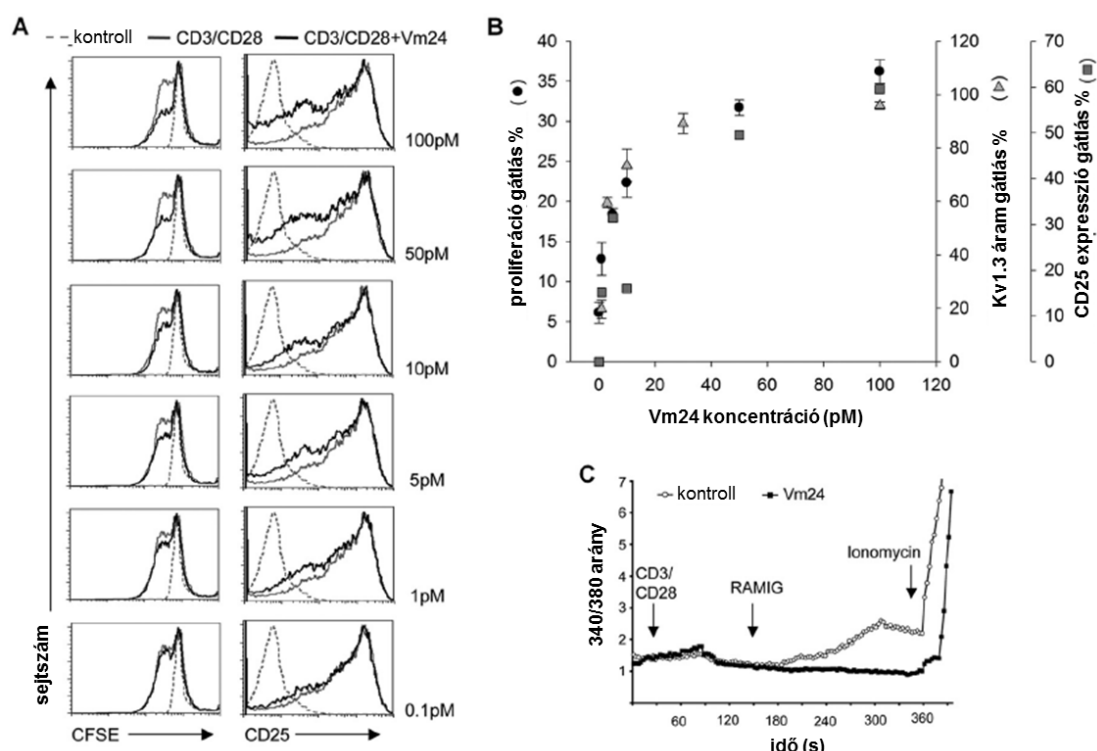
További kísérletekben kimutattuk, hogy a Vm24 pM-os koncentrációban gátolja a T-sejtek  $Ca^{2+}$  jelét, proliferációját, CD25 expresszióját, azaz *in vitro* immunszuppressziót okoz (54. ábra).

Ezek után vizsgáltuk a toxin *in vivo* immunszuppresszív hatását úgy, hogy meghatároztuk, hogy milyen mértékben képes gátolni a Vm24 a patkányok fülében kiváltott aktív vagy adoptív késői hiperszenzitivitási reakciót (Delayed Type Hypersensitivity reaction = DTH). A kiváltott DTH reakció során a bőrbe migráló  $T_{EM}$  sejtek okoznak gyulladást (230). Az aktív DTH esetén ovalbuminnal immunizáltuk az állatokat, majd az ovalbumin újbóli alkalmazásával váltottuk ki a reakciót, ami az érintett fül gyulladását és duzzadását idézte elő. Adoptív DTH során előzetesen *in vitro* aktivált Ova-GFP T-sejteket juttattunk az állatokba, majd szintén ovalbumin alkalmazásával váltottuk ki a reakciót. A kezelt csoport egyszeri szubkután 0,1 mg/kg Vm24 dózist kapott a második ovalbumin alkalmazással egy időben, míg a kontroll állatokba PBS-t injektáltunk. A DTH reakció mértékét 24 órával később vizsgáltuk a fül duzzadásának



mérésével (változás a fül vastagságában, lásd az Anyagok és Módszerek leírásában). Az 55. ábrán látható, hogy a Vm24 egyetlen dózisa szignifikánsan csökkentette a DTH reakciót a kontroll értékek ~35 illetve 65 %-ára az aktív illetve az adoptív DTH esetén, ami a Vm24 *in vivo* hatásosságát bizonyítja.

A demonstrált tulajdonságok alapján a Vm24 az eddigi ismert egyik legjobb tulajdonságú Kv1.3 csatorna gátlószer, mely kiindulási molekulaként szolgálhat a terápiás célú felhasználás irányába.



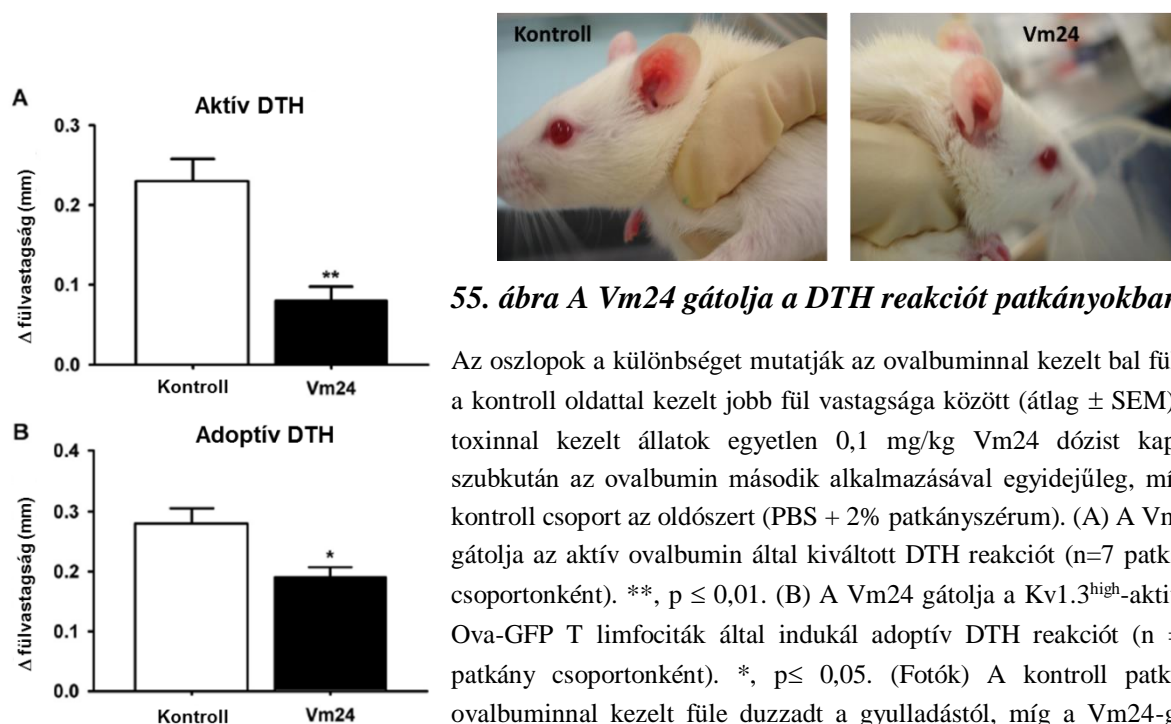
#### 54. ábra A Vm24 *in vitro* hatásai T-sejt funkciókra

(A) A proliferációra és CD25 expresszióra kifejtett hatások. (Bal oszlop) A Vm24 gátolta a CD3-CD28 indukált proliferációt. Nyugvó T-sejteket aktiváltunk a CD3-CD28 útvonalon Vm24 nélkül (CD3/CD28, szürke) vagy a jelölt koncentrációjú Vm24 jelenlétében (CD3/CD28 + Vm24, fekete). A sejtek proliferációját 96 h múlva vizsgáltuk a CFSE hígulásán keresztül. A szaggatott vonal (kontroll) jelzi a CFSE szintet a stimulálatlan sejtek esetén. (Jobb oszlop) A Vm24 hatása a CD25 expresszióra. Nyugvó humán CD4<sup>+</sup> limfocitákat aktiváltunk a CD3-CD28 útvonalon, és 24 órás stimulációt követően áramlási citometriával vizsgáltuk a CD25 expresszió szintjét. A jelölések megegyeznek a bal oldalon használtakkal.

(B) Az áramgátlás (1-RCF, háromszög), a proliferáció gátlás (kör) és a CD25 expresszió gátlás (négyzet) dózis-hatás függvényeinek átfedése. (C) A Vm24 gátolja a CD3-CD28-függő Ca<sup>2+</sup> mobilizációt. Fura-2 hányadosokat ábrázoltunk reprezentatív T-sejtekből. Humán perifériás T-sejtek kalcium válaszai anti-CD3 és anti-CD28, valamint RaMIG (egér-ellenes nyúl) antitestek alkalmazását követően Vm24 nélkül (szürke), vagy 10 nM Vm24 jelenlétében (fekete). A kísérlet végén a kalcium ionofór ionomycint alkalmaztunk pozitív kontrollként. Az ábra legalább három független kísérlet eredményeit reprezentálja.



Vizsgáltuk a Vm24 toxicitását is egerekben. A *Vm smithi* oldható mérgéből 50–200  $\mu\text{g}$  mennyiséget injektálva egerekbe (20 g testtömeg) nem tapasztalunk mérgezéses tüneteket. Bár a teljes méreg nem bizonyult toxikusnak, a tisztított peptid hasonló dózisban előidézhethet toxicitási tüneteket, mivel a tisztítás során az aktív komponens feldúsul a mintában. Ezért tiszta Vm24-et is injektáltunk egerekbe a teljes méreggel hasonló dózisokban (50–200  $\mu\text{g}/20$  g egér), de még a legmagasabb 200  $\mu\text{g}/20$  g (= 10 mg/kg egér tömeg) koncentráció esetén sem figyeltünk meg toxicitásra utaló tüneteket.



**55. ábra A Vm24 gátolja a DTH reakciót patkányokban.**

Az oszlopok a különbséget mutatják az ovalbuminnal kezelt bal fül és a kontroll oldattal kezelt jobb fül vastagsága között (átlag  $\pm$  SEM). A toxinnal kezelt állatok egyetlen 0,1 mg/kg Vm24 dózist kaptak szubkután az ovalbumin második alkalmazásával egyidejűleg, míg a kontroll csoport az oldószert (PBS + 2% patkányszérum). (A) A Vm24 gátolja az aktív ovalbumin által kiváltott DTH reakciót ( $n=7$  patkány csoportonként). \*\*,  $p \leq 0,01$ . (B) A Vm24 gátolja a Kv1.3<sup>high</sup>-aktivált Ova-GFP T limfociták által indukált adoptív DTH reakciót ( $n = 9$  patkány csoportonként). \*,  $p \leq 0,05$ . (Fotók) A kontroll patkány ovalbuminnal kezelt füle duzzadt a gyulladástól, míg a Vm24-gyel kezelt állat kezelt füle lényegesen kevésbé gyulladt.

### 5.2.2 Az anurotoxin szelektivitásának javítása célzott pontmutációkkal

Ebben a projektben célunk egy ismert Kv1.3-gátló toxin szelektivitásának javítása volt. Kísérleteinket egy, korábban munkacsoportunk által az *Anuroctonus Phaiodactylus* mexikói skorpió mérgéből izolált 35 aminosavból álló peptid toxinnal, az anurotoxinnal végeztük. Előzőleg kimutattuk, hogy bár e toxin több ioncsatornán hatástalan volt, a Kv1.3 mellett a Kv1.2 csatornát is nagy affinitással gátolta (209). Mivel a Kv1.2 csatorna számos idegsejtben megtalálható, ez erősen korlátozza a potenciális terápiás alkalmazás lehetőségét. Ezért célunk az volt, hogy a toxin affinitásának megtartása mellett annak szelektivitásán javítsunk.

A szelektivitás javítása érdekében létrehozott pontmutációk helyét két technikával határoztuk meg. Egyrészt ismert szelektivitású toxinok szekvenciáját hasonlítottuk össze, és a

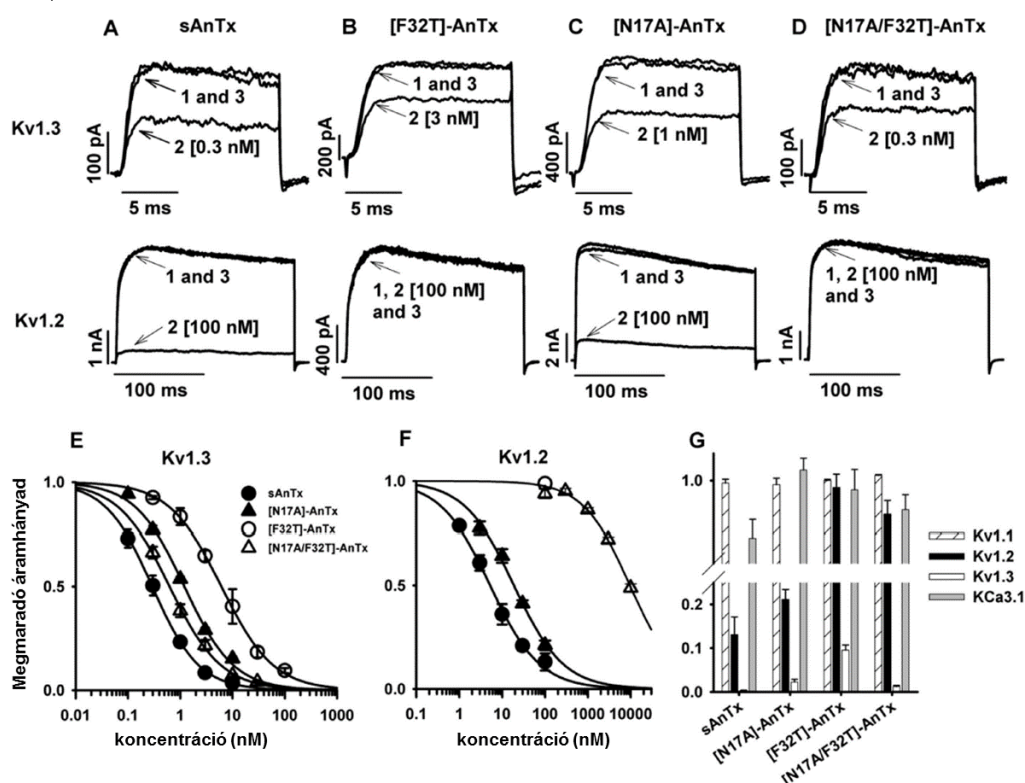
toxinokat a Kv1.2 és 1.3 iránti disszociációs állandójuk hányadosa alapján 1.2, 1.3, vagy átmeneti szelektivitásuként csoportosítottuk (1. táblázat 81.o). A szekvenciák alapján sok hasonlóság mellett (pl. a gátláshoz szükséges centrális lizin) több különbség is észrevehető az 1.2 és 1.3-szelektív toxinok között. A legfontosabb, hogy a diád aromás pozíciójában elhelyezkedő tirozin a Kv1.2 szelektív és átmeneti szelektivitású toxinokra jellemző, míg a Kv1.3 iránt magasabb szelektivitást mutató toxinokban polárosabb aminosav van itt jelen. Bár az anuroctoxinban nem tirozin van e pozícióban, de egy szintén aromás fenilalanin, aminek polárosabb aminosavra cseréjétől a Kv1.3 iránti szelektivitásának növekedését vártuk. A kritikus lizin után két pozícióval (az 1. táblázatban keretezve) a Kv1.2-szelektív csatornában izoleucin, míg a Kv1.3-szelektívekben metionin található. Mivel az AnTx-ben szintén metionin van, ebben a pozícióban nem végeztünk változtatást. Szintén megfigyelhető volt jellegzetes mintázat az AnTx 17-es pozíciójának megfelelő helyen (az 1. táblázatban keretezve, a szaggatott vonaltól balra) a Kv1.2-szelektív csatornában pozitív, vagy poláros oldalláncú aminosavak, míg a Kv1.3-szelektívekben apoláros alanin vagy negatív glutamát figyelhető meg.

A második módszer egy másik skorpiótoxinnal, a fentebb részletesen tárgyalt Css20-szal, mely szintén gátolta e két csatornát, végzett számítógépes modellezés eredményének analízise volt. A toxin dokkolását szimuláltuk a Kv1.2 és 1.3 csatornához, és így meghatározhattuk a legvalószínűbb kölcsönható partnereket, melyből következtethettünk a szelektivitást befolyásoló aminosavakra.

Ezen analízisek alapján a következő mutációkat terveztük meg: N17A (a természetes anuroctoxinban 17. pozícióban lévő aszparagint alaninra cseréltük), F32T (a természetes anuroctoxinban 32. pozícióban lévő fenilalanint treoninra cseréltük), és a két mutációt együttesen tartalmazó N17A/F32T dupla mutánst. A anuroctoxin vad típusú (kontroll) és mutáns változatait szilárd fázisú kémiai szintézissel állította elő kollaborációs partnerünk Prof. Tóth Gábor és munkacsoportja a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében. Ezen toxinok hatását a patch-clamp technika teljes-sejt konfigurációjában mértük endogén Kv1.3 csatornákat expresszáló aktivált humán T sejteken vagy Kv1.2 csatornagénnel transzfektált HEK-tsA sejteken.

Először a natív és a szintetikus vad-típusú toxint hasonlítottuk össze, és azt találtuk, hogy mind a Kv1.3, mind a Kv1.2 csatornákat hasonló affinitással gátolták, így a szintézis sikeresnek bizonyult. Ezután a mutánsokat vizsgáltuk. Felvettük a dózis-hatás görbéket, és azt tapasztaltuk,

hogy bár a vad-típushoz képest némileg csökkent az F32T affinitása, a Kv1.3 csatornákat továbbra is hatékonyan gátolta, de a Kv1.2 csatornát nem blokkolta számottevő mértékben még 100 nM koncentrációban sem (56. ábra). A 17. pozícióban lévő aszparagin alaninra történő módosítása (N17A) mind a Kv1.2 és Kv1.3 csatorna esetén csökkent affinitást eredményezett, a szelektivitásra nem volt hatással. A dupla mutáns anuroctoxin, mely mindkét mutációt együttesen tartalmazza (N17A/F32T) IC<sub>50</sub> = 0,6 nM félhatásos koncentrációval gátolta a Kv1.3 csatornát, mely mind a természetes és a szintetikus vad típusú toxin hatásával megegyezik, ugyanakkor a Kv1.2 csatornát csak 9,6  $\mu$ M félhatásos koncentrációval gátolta, azaz 16000-szeres szelektivitással bír a Kv1.3 iránt. Megvizsgáltuk a toxinok hatását még két másik csatornára is: a legközelebbi rokon Kv1.1 és a T sejtekben megtalálható másik K csatornára, az KCa3.1-re is, és a mutánsok ezeken is hatástalanok voltak.



**56. ábra** A szintetikus AnTx variánsok szelektivitási profilja

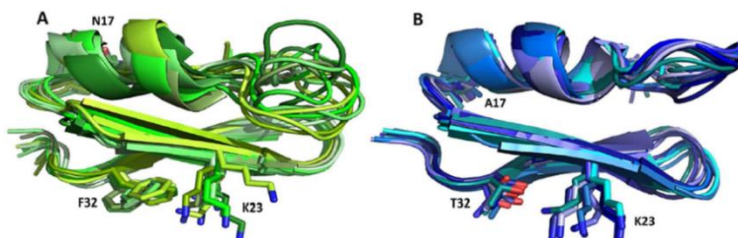
A (A) sAnTx, (B) [F32T]-AnTx, (C) [N17A]-AnTx és (D) [N17A/F32T]-AnTx toxinok hatása Kv1.3 és Kv1.2 csatornákra. **Felső sor:** Kv1.3 áramok aktivált humán limfocitákon. A görbék a K<sup>+</sup> áramot mutatják a toxin alkalmazása előtt (1), a gátlási egyensúly kialakulása után a jelzett koncentrációjú toxin jelenlétében (2), és kimosás után (3). **Alsó sor:** Teljes-sejt Kv1.2 áramok transzfektált CHO sejteken. A jelölések megegyeznek a felső soréval. A (E) Kv1.3 és (F) Kv1.2 K<sup>+</sup> áram gátlásának dózis-függése sAnTx (tele kör), [N17A]-AnTx (tele háromszög), [F32T]-AnTx (üres kör), és [N17A/F32T]-AnTx esetén. (G) Az AnTx variánsok hatása Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 és KCa3.1 csatornákra 100 nM-os koncentrációban. Az oszlopok az átlagos megmaradó áramhányadot mutatják 3-5 független kísérletből +50 mV-os depolarizáció esetén.

Összességében tehát sikerült a toxin Kv1.3 iránti szelektivitását nagy mértékben javítani az affinitás megtartása mellett, s ezzel egy lényegesen jobb tulajdonságú toxint előállítani. E toxin tehát kiváló alapja lehet a T sejt-mediált autoimmun betegségek kezelésére kifejlesztendő gyógyszereknek.

Ezek után arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a toxin molekulában milyen strukturális változás okozhatta a szelektivitás ilyen mértékű javulását. Ennek felderítéséhez kollaborációs partnerünk, Prof. Dr. Kövér Katalin munkacsoportja (Debreceni Egyetem, TTK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék), NMR vizsgálatokkal és molekuláris dinamikai (MD) szimulációkkal hasonlította össze a vad-típusú és a módosított toxin szerkezetét és dinamikáját.

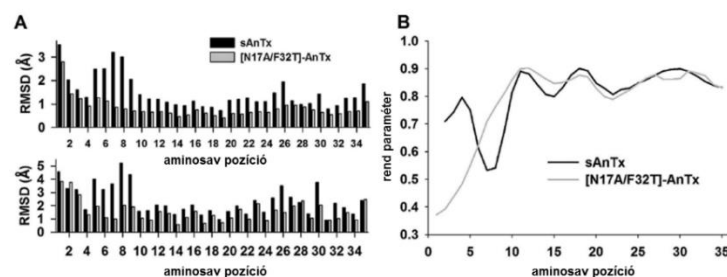
Eredményeik azt mutatták, hogy a vad-típusú, kevésbé szelektív toxin lényegesen nagyobb flexibilitást mutat a peptid egészére nézve, de különösen az N-terminális közelében, a merevebb szerkezetű mutáns toxinhoz képest. Ez látszik mind az NMR struktúrákon (57. ábra), mind az MD szimulációkból származó atomi fluktuáció (RMSD = root-mean-square deviation of atomic positions), valamint rend paraméter adatokból (58. és 59. ábrák). Ezek alapján a flexibilisebb WT toxin jobban képes alkalmazkodni a két  $K_v$  csatorna eltérő pórusrégiójához, így „jobban passzoló” kontakt felszínt, s ezzel nagy affinitású gátlást képes kialakítani mindkét csatornával, mint a merevebb, csak a Kv1.3-mal komplementer felszínnel bíró dupla mutáns toxin.

#### 57. ábra Az sAnTx és a [N17A/F32T]-AnTx NMR szerkezete

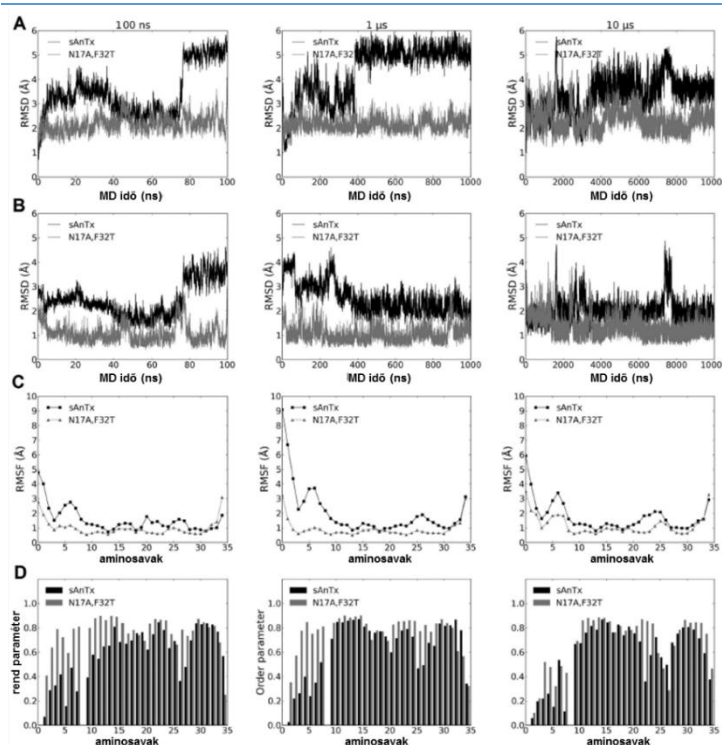


10 NMR struktúra együttese, melyek megfelelnek a kötőhossz, kötőszög és NOE kritériumoknak a (A) sAnTx és a (B) [F32T]-AnTx toxinokra. A vad-típusú toxin lényegesen nagyobb flexibilitást mutat.

#### 58. ábra Az sAnTx és a [N17A/F32T]-AnTx szerkezeti összehasonlítása



(A) Az atomi koordináták pozíciónkénti RMSD értékei. A felső panel a főlánc atomjainak adatait, míg az alsó az összes nehéz atom adatait mutatja sAnTx-re (fekete) és [N17A/F32T]-AnTx-re (szürke). (B) A kémiai eltolódásokból számolt aminosavankénti rendparaméterek ( $S^2$ ) összehasonlítása. A rendparaméter 0-1 közötti értéket vehet fel, az 1 egy teljesen merev, a 0 pedig egy flexibilis aminosavnak felel meg.



**59. ábra** Az sAnTx és a [N17A/F32T]-AnTx összehasonlítása 100 ns, 1  $\mu$ s és 10  $\mu$ s hosszú MD-szimulációkban

Az adatok a sAnTx-re (fekete) és [N17A/F32T]-AnTx-re (szürke) vonatkoznak. A szerkezetek RMSD értékei a főlánc atomjaira számolva a kiindulási (A) és az átlagolt (B) struktúrához képest.

(C) Fluktuációk az atomi pozíciókban a kiindulási szerkezethez képest.

(D) Az NH kötés vektorainak rendparaméterei.

### 5.3 A szív feszültség-függő Nav1.5 csatorna kapuzásának vizsgálata

#### 5.3.1 A feszültség-szenzor domének mozgásának vizsgálata

##### 5.3.1.1 A vad-típusú hNav1.5 kapuzása

Az Nav1.5 csatorna kapuzásának molekuláris szintű vizsgálatához feszültség-zár fluorometriát alkalmaztunk, melyet a csatorna igen gyors kapuzási kinetikája miatt a módszerek leírásában részletesen ismertetett cut-open (COVG) technikával kombináltunk (231). Az Nav csatorna egyes doménjeit megjelölve, a VCF technikával jól vizsgálhatók e domének egyedi konformáció-változásai, melyekről az ionáram vagy a kapuzási áram mérése nem szolgáltat információt. Ilyen jellegű mérések korábban születtek az izomban kifejeződő Nav1.4 csatornával kapcsolatban (183, 232), az aritmiák kialakulásának és a szívre szelektív gátlószerek hatásmechanizmusának megértéséhez azonban szükségesek a csatorna-specifikus vizsgálatok, mivel jelentős eltérések lehetnek a két csatorna kapuzásában. A mérések elvégzésének első feltétele a VCF mérésekhez szükséges cisztein-mutánsok előállítása volt. A Na<sup>+</sup> csatorna esetében ez négy különböző mutáns előállítását jelenti a négy domén jelölhetőségéhez, szemben a K<sub>v</sub> csatornáknál szükséges egyetlen mutánssal. Mivel a K<sub>v</sub> csatornák négy azonos alegységből szerelődnek össze, csatornánként négy fluorofór is szolgáltathatja a jelet, míg ez az Nav csatornáknál csak egy fluorofór csatornánként, azaz a jel nagysága jellemzően kisebb.



Első célunk tehát négy olyan Nav1.5 konstrukt létrehozása volt, mellyel az egyes domének VSD-inek konformáció-változásait nyomon követhettük. A fluoreszcens jel mérésére irányuló kezdeti kísérleteink sikertelenek voltak a hNav1.5 elégtelen expressziója miatt, mely lényegesen alacsonyabb volt, mint az rNav1.4 esetében, melyet a korábbi VCF adatok gyűjtéséhez használtak. A két csatorna szekvenciájának összehasonlításából kiderült, hogy a hNav1.5 tartalmaz egy ubikvitinációs motívumot, mely fokozza a csatorna körforgását, és így csökkenti a csatornák számát a membránban, viszont nincs jelen az Nav1.4 csatornában. E motívum megszüntetése a Y1977A mutációval, és a  $\beta_1$  alegységet kódoló RNS koinjektálása azonban megnövelte az Nav1.5 expresszióját a megfelelő szintre. Létrehoztuk továbbá a C373Y mutációt, mely megnöveli a csatorna TTX-érzékenységét, és így lehetővé teszi az ionáramok gátlását, ami szükséges a kapuzási áramok méréséhez, valamint eltávolít egy kívülről hozzáférhető ciszteint, ami pedig megakadályozza a festékekkel történő nem-specifikus jelölést (60. ábra).

Két mérési protokoll futtatásával hasonlítottuk az új konstruktokat a vad-típushoz. Elsőként a vezetőképesség feszültség-függését (G-V) határoztunk meg egy depolarizáló impulzus-sorozat alatt mért áramamplitúdókat osztva a hajtóerővel. A másodikkal az egyensúlyi inaktiváció (steady-state inactivation = SSI) feszültség-függését határoztuk meg rövid, -20 mV-os impulzusokkal, melyek előtt különböző feszültségeken tartottuk a membránt 200 ms időtartamig. A mutációk nem módosították jelentősen a G-V vagy SSI görbéket, így a fluoreszcencia mérésekhez szükséges mutációkat ezen a mutáns háttéren hoztunk létre, melyet WT-LFS-nek nevezünk el (Wild-Type, Large Fluorescence Signal).

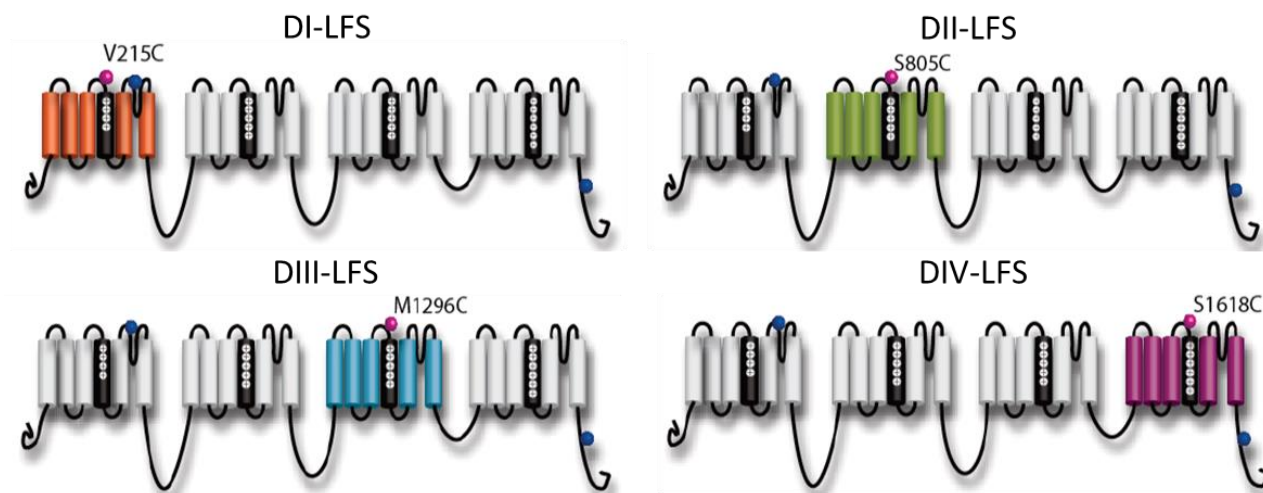
#### 60. ábra A WT-LFS konstrukt



A vad-típusú hNav1.5 csatornában létrehoztuk a C373Y (a TTX szenzitivitás növelése érdekében) és Y1977A (az expressziós szint növelése érdekében) mutációkat, mely a fluoreszcenciás mutánsok alapjául szolgált.

A VCF mérésekhez szükséges, az egyes doménekben cisztein mutációt hordozó mutánsokat ennek megfelelően DI-LFS, DII-LFS, DIII-LFS, és DIV-LFS jelöléssel illettük. Minden domén esetében több pozíció kipróbálása is szükséges volt a cisztein mutációhoz, hiszen nem minden mutáns expresszálódik, vagy generál használható fluoreszcens jelet. Az egyes domének esetén végül a következő mutánsokat alkalmaztuk a VCF mérések során:

V215C (DI-LFS), S805C (DII-LFS), M1296C (DIII-LFS), S1618C (DIV-LFS), melyek mind az adott domén S3-S4 extracelluláris összekötő szakaszán találhatók (61. ábra).



**61. ábra** A VCF mérésekhez használt konstruktok

A WT-LFS háttérén létrehozott Cys-mutáns konstruktokkal az egyes domének VSD mozgását tudjuk követni. A mutációkat az adott domén S3-S4 összekötő szakaszán hoztuk létre. A legjobb fluoreszcenciás jeleket a V215C (DI-LFS), az S805C (DII-LFS), az M1296C (DIII-LFS) és S1618C (DIV-LFS) mutánsokkal kaptuk.

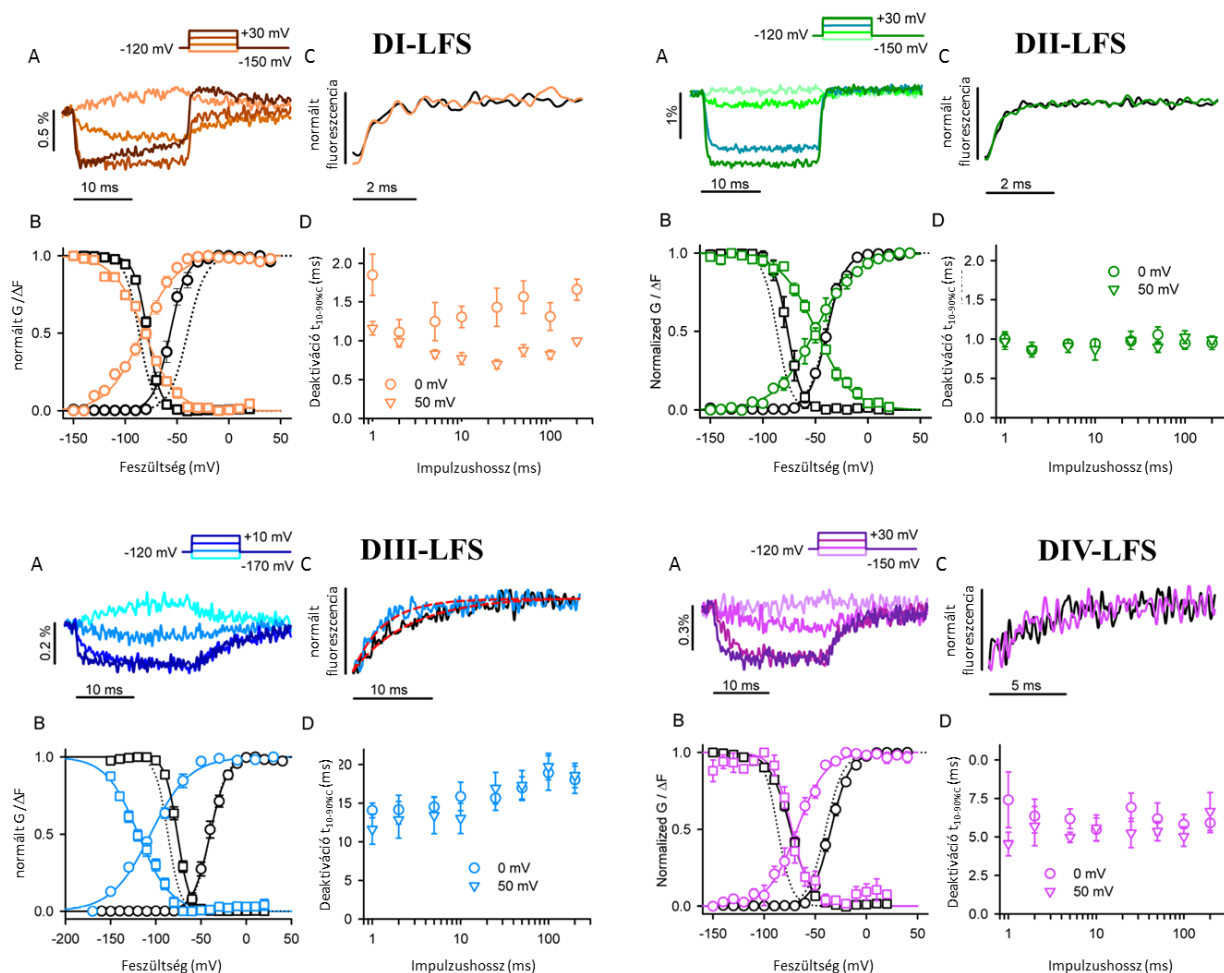
Mivel a fluorofórt a kapuzásban kulcsszerepet játszó VSD-k közelében kapcsoltuk a csatornához, várható volt, hogy ez bizonyos mértékben módosíthatja a kapuzást. Ennek megfelelően a TAMRA-MTS jelölés különböző mértékű eltolódásokat okozott mind a G-V ( $\Delta V_{1/2} = -17 - +1$  mV), mind az SSI görbékben ( $\Delta V_{1/2} = +8 - +12$  mV) az egyes konstruktokban.

A festékekkel jelölt csatornákon futtatva a fentebb leírt feszültség-protokollokat lehetővé vált az áram mérésével egyidejűleg a VSD-k konformáció-változásait is nyomon követni. A G-V protokollal mért fluoreszcencia jelekből megkonstruálható az F-V görbe, mely a jelölt domén VSD aktivációjának feszültség-függését jellemzi. Az SSI protokoll alatt regisztrált fluoreszcenciás jelekből pedig az SSI F-V görbéket határoztuk meg. Amennyiben mindkét görbe egy egyszerű kétállapotú rendszer nyugvó és aktivált állapotai között végbemenő átmenet feszültség-függését írja le, úgy azok egymás tükörképei lesznek, és az 50%-os y-tengely értéknél metszik egymást. Mivel azonban az SSI protokoll során egy adott teszt-feszültségen lényegesen hosszabb időt tölt a csatorna, lehetőség nyílik lassabban betölthető „mélyebb”, jellemzően, inaktivált állapotok elérésére, s így csökken a nyugvó és aktivált állapotban levő csatornák száma, ezért a jel felvételéhez használt erős depolarizáció során detektált jel kisebb



lesz, mintha a teszt-feszültségen rövidebb időt töltött volna. Mivel egy adott feszültségen az SSI-FV görbe értéke kisebb lesz a vártnál, ez a görbe balra tolódását jelenti, és azt, hogy az FV görbét az 50%-os érték alatt fogja metszeni. A két görbe csak egyikének eltolódása tehát további „mélyebb” állapotok megjelenését jelzi az aktivációs vagy inaktivációs útvonal mentén.

A homotetramer  $K_v$  csatornákkal ellentétben méréseink alapján az  $Nav1.5$  egyes doménjeinek a VSD-i nagyon különböző feszültség-függéssel és kinetikával aktiválódnak: aktivációjuk több, mint 50 mV-os feszültségtartományt fed le (62. ábra). A DIII VSD aktiválódik a legnegatívabb membránpotenciálnál ( $V_{1/2} = -106,0 \pm 3,2$  mV), melyet DI követ ( $-83,9 \pm 2,8$ ), majd DIV ( $-66,8 \pm 3,4$ ), és végül DII ( $-51,4 \pm 2,4$ ). Mind a négy VSD negatívabb feszültségnél aktiválódik, mint az áram aktivációját jellemző G-V görbe ( $V_{1/2} = -39,9 \pm 2,9$  mV, WT-LFS). Mivel az ionáram és a VSD aktivációja időben különböző függvényeket követ, a kinetikák összehasonlíthatósága érdekében megmértük az időtartamot a csúcsáram 10 és 90%-os értéke között, valamint meghatároztuk a  $t_{10-90\%C}$  értékeket a fluoreszcenciás jelekből (lásd a Módszerek leírásában). A DI, DII és DIII VSD-k hasonló kinetikával aktiválódtak (rendre  $t_{10-90\%C} = 0,82 \pm 0,08$ ;  $0,98 \pm 0,07$  és  $0,81 \pm 0,09$  ms +30 mV-nál,  $n=5$ ,  $p=0,332$ ). Ezek az értékek lassabbak, mint az ionáramra kapott aktivációs kinetika ( $t_{10-90\%} = 0,24 \pm 0,02$  ms), azonban az áram szigmoid aktivációja által okozott késlekedés miatt az áram és fluoreszcencia jelek felfutása időben átfedett. Ez a megfigyelés egybevág a Hodgkin-Huxley féle modellel, mely az  $Nav$  csatornák aktivációját 3 aktivációs „kapuval” jellemzi, ami alapján az áram szigmoid felfutása várható, mivel az csak mindhárom VSD aktivációja után következhet be. Szintén egybevág a HH modellel a DIV-VSD lényegesen lassabb aktivációja ( $t_{10-90\%C} = 1,91 \pm 0,18$  ms +30 mV-nál,  $n=7$ ,  $p<0,001$ ), mivel ez a domén felelős a gyors inaktiváció kialakulásáért, és csak a másik három VSD aktivációját követően aktiválódhat.



## 62. ábra Fluoreszcencia jelek a négy Cys-mutáns konstruktból

A V215C (DI-LFS, bal felül), az S805C (DII-LFS, jobb felül), az M1296C (DIII-LFS, bal alul) és az S1618C (DIV-LFS, jobb alul) konstruktok fluoreszcenciás jelei láthatók az (A) paneleken, melyeket a COVG technikával rögzítettünk. A membránpotenciált -100 mV-os tartófeszültségre 50 ms időtartamra -120 mV-ra állítottuk, majd 20 ms-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk -170 (DIII) vagy -150 mV-tól (DI, DII és DIV) +30 mV-ig 20 mV-os lépésekben, ahogy a betétabrákon mutatják a feszültség protokollok. A depolarizáló impulzust követően -120 mV-ra léptünk vissza 50 ms időtartamra. Az átláthatóság kedvéért csak minden harmadik depolarizáló impulzus jelét ábrázoltuk. (B) G-V (fekete körök) és SSI (fekete négyzetek) valamint a megfelelő F-V és SSI F-V görbék (színes körök és négyzetek). A G-V és F-V görbék az (A) panelnél leírt protokollal vettük fel, míg az SSI és SSI F-V görbék meghatározásához a membránt az adott feszültségen tartottuk 200 ms-ig, majd -20 mV-ra léptünk. Az SSI görbén a -20 mV-nál mért normált áramot ábrázoljuk, míg az SSI F-V görbénél a  $\Delta F$  értéket a kondicionáló potenciálon és a -20 mV-on mért fluoreszcenciás jelek különbségéből határoztuk meg és normáltuk a legnagyobb értékre. A pontozott vonalak a WT-LFS G-V és SSI görbéit mutatják. (C) Fluoreszcenciás jelek, melyeket 2 (fekete) vagy 200 ms-os (színes) +50 mV-ra történő depolarizációt követően mértünk -120 mV-os feszültségen. DIII-LFS esetén a piros vonalak az illesztett exponenciális függvényeket mutatják. (D) A fluoreszcenciás jelek deaktivációját 1-200 ms időtartamú 0 vagy +50 mV-ra történő depolarizációt követően mértük -120 mV-os feszültségen. A jelekre illesztett exponenciális függvények időállandóiból számoltuk ki a  $t_{10-90\%,C}$  értékeket, melyeket ábrázoltunk.

Egyéb érdekes megfigyeléseket is tettünk az egyes domének esetében. A DII F-V görbéjének középpontja 12,5 mV-tal negatívabb a G-V görbéjénél, mutatva, hogy a DII-VSD az áram aktivációját megelőzően kezd mozogni, viszont enyhébb meredeksége miatt később telítődik a görbe, mint a konduktancia görbéje, ami arra utal, hogy a két folyamat között nincs szoros csatolás – a pórus nyitása megelőzheti a DII-VSD teljes aktivációját. Hasonlóképpen, a DII SSI és SSI-FV görbéinek összehasonlításából kiderül, hogy az áram inaktivációja negatívabb membránpotenciáloknál megtörténik, mint a DII-VSD aktivációja (rendre  $V_{1/2} = -79,2$  ill.  $-52,2$  mV), és az inaktivációs görbe lényegesen meredekebb is, mint a DII-VSD aktivációé ( $k = -6,5$  ill.  $-17,5$  mV,  $p < 0,001$ ). Ez azt jelenti, hogy olyan tartófeszültségeknél, melyeknél teljesen megszűnik a vezetőképesség az inaktiváció révén ( $V > -50$  mV), a DII-VSD még távol van a teljesen aktivált állapotától, ami alapján valószínű, hogy nem vesz részt a zárt állapotú inaktiváció kialakulásában.

A DII-vel ellentétesen, a DIII-VSD aktivációja nagy feszültség-különbséggel megelőzi a pórus nyitását, és inaktiváció során is a VSD mozgás döntő része megtörténik, még mielőtt a konduktanciában észrevehető csökkenés lépne fel az inaktiváció miatt.

Különböző hosszúságú depolarizáló impulzusokat követően visszatérve a negatív tartófeszültségre, megmértük az egyes VSD-k visszatérési, azaz deaktivációs kinetikáját. Már korai tanulmányok beszámoltak arról, hogy Nav csatornában hosszabb depolarizációt követően a kapuzási töltés egy része „immobilizálódik”, azaz lassabban tér vissza, mint rövid depolarizáció után, az inaktiváció kialakulása miatt (116). Későbbi VCF mérések a patkány izom rNav1.4 csatornán a DIII és DIV VSD-k lassabb visszatérésének tulajdonították az immobilizáció jelenségét (183). Méréseink alapján a DI és DII VSD-k gyorsan, és a depolarizáció hosszától független sebességgel térnek vissza az aktivált állapotból (DI:  $t_{10-90\%C} = 0,99 \pm 0,09$  ms 2 ms depolarizáció után és  $0,99 \pm 0,05$  ms 200 ms depolarizáció után; DII:  $t_{10-90\%C} = 0,86 \pm 0,12$  ms 2 ms után, és  $0,99 \pm 0,05$  ms 200 ms után). Ezzel szemben a DIII-VSD deaktivációja már rövid depolarizációt követően is lényegesen (legalább 10-szer) lassabb a másik két doménhez viszonyítva, de még ehhez képest is szignifikánsan lassul hosszú depolarizációt követően ( $t_{10-90\%C} = 12,85 \pm 0,92$  ms 2 ms után és  $18,58 \pm 0,61$  ms 200 ms után,  $n=6$ ,  $p=0,009$ ). A DIII-VSD deaktivációjának hosszú depolarizációt követő jelentős lassulását az okozhatja, hogy a csatorna „mélyebb” inaktivált állapotokat ér el, melyek stabilizálják a DIII-VSD aktivált konformációját. A DIV-VSD deaktivációja jelentősen lassabb volt a DI és DII-es

doméneknel, de 2-3-szor gyorsabb, mint a DIII-é. Meglepő módon a DIV-VSD deaktiváció nem lassult szignifikánsan a növekvő impulzushosszal ( $t_{10-90\%C} = 5,71 \pm 1,27$  ms 2 ms után és  $6,63 \pm 1,23$  ms 200 ms után,  $n=4$ ,  $p=0,411$ ). A DIV inaktivációban játszott kulcsszerepének ismeretében a lassulás hiánya a hosszabb depolarizációk esetén igen váratlan megfigyelés volt és egyértelmű ellentétben áll a Nav1.4-nél kapott eredményekkel, viszont alátámasztja azokat az eredményeket, melyek MTS reagenseket alkalmazva azt mutatták, hogy az Nav1.5 csatorna DIV-VSD kapuzási töltésének immobilizációja független az inaktivációtól (184). Bár más módszert alkalmazva, de e tanulmány is azt találta, hogy az inaktivációs motívum csak a DIII-VSD töltés visszatérését modulálta, és a DIV-ét nem. Ezen eredményünk feloldja az ellentmondást e korábbi közlemények között, rámutatva, hogy még az egy családba tartozó csatornák között is lehet lényeges eltérés a kapuzás mechanizmusában, és a két csatornában különböző a DIII és DIV-VSD kapcsolata az inaktivációval.

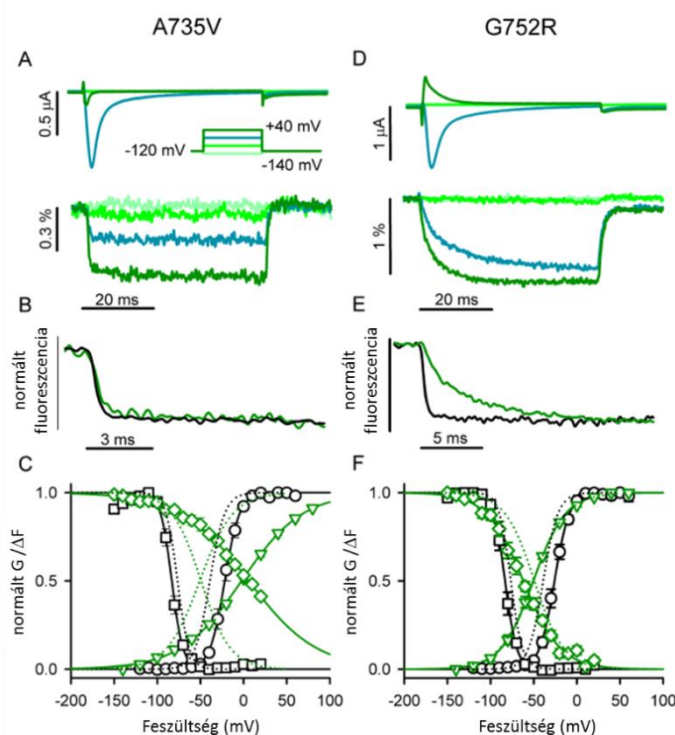
#### 5.3.1.2 Brugada-szindróma mutáns csatornák kapuzása

A továbbiakban molekuláris szinten vizsgáltuk két Brugada-szindrómát (BrS) okozó, a DII-VSD-ben pontmutációt hordozó Nav1.5 csatornát, az A735V és G752R mutánsokat. A Brugada-szindróma egy örökletes szívbetegség, melyet három típusú, jellegzetesen megváltozott EKG egyike és a hirtelen szívhalál emelkedett kockázata jellemez. A halál oka BrS esetén kamrai fibrilláció. Több gén mutációja is felelős lehet a BrS kialakulásáért, de az esetek mintegy 20 %-ában az Nav1.5 pórusformáló  $\alpha$ -alegységét kódoló gén funkcióvesztéses mutációja okozza, azaz csökkent  $Na^+$  beáramlással jár. A VCF vizsgálatokhoz a mutációkat a DII-LFS háttéren hoztuk létre. Az A735V mutáns F-V és SSI F-V görbéi drámai mértékben jobbra tolódtak a DII-LFS-hez képest (rendre +49,1 és 58,5 mV-tal), valamint a csatorna saját G-V és SSI görbéihez képest is (+19,5 és +89,1 mV-tal, 63. ábra). Ezen felül a mutáció a DII-VSD feszültség-függését is jelentősen lecsökkentette, mindkét görbe meredeksége lényegesen enyhébb lett ( $k_{FV}$ : 20,5  $\rightarrow$  35,4 mV;  $k_{SSIFV}$ : -17,5  $\rightarrow$  -39,5 mV). A DII-VSD aktivációs kinetikája is lassult a mutáció hatására (+40 mV-nál a  $t_{10-90\%C}$  értékek: DII-LFS:  $0,99 \pm 0,08$  ms, DII-LFS-A735V:  $1,49 \pm 0,13$  ms,  $p=0,005$ ), de még látványosabb változás, hogy a mutáns DII-VSD aktivációs sebessége elvesztette feszültség-függését ( $1,45 \pm 0,15$  ms -20 mV-nál, és  $1,49 \pm 0,13$  ms +40 mV-nál,  $n=5$ ,  $p=0,850$ ) szemben a DII-LFS konstrukttal ( $1,42 \pm 0,08$  ms -20 mV-nál, és  $0,99 \pm 0,08$  ms +40 mV-nál,  $n=8$ ,  $p=0,002$ ). Ezzel szemben az ionáram aktivációja

megőrizte feszültség-függését a mutánsban, de szignifikánsan lassabb volt a DII-LFS kinetikájánál  $< 10$  mV feszültségeknél ( $t_{10-90\%}=1,48\pm0,06$  ms ill.  $0,71\pm0,11$  ms,  $-20$  mV-nál,  $p=0,002$ ; 64. ábra).

Az A735V mutánsban a csatorna nyitási valószínűsége már  $0$  mV-nál közel  $100\%$ -os, miközben a DII-VSD még  $+80$  mV-nál sem aktiválódik teljes mértékben. Ez a jelenség a DII-LFS-nél is megfigyelhető, bár jóval kisebb mértékben, ami arra utal, hogy ez az  $Na_v1.5$  inherens tulajdonsága, amit az A735V mutáció jelentősen felerősít. Ezek alapján a DII-VSD aktivációja csak facilitálja a csatorna nyitását egy allosztérikus mechanizmuson keresztül, ahol a VSD aktiváció hiánya csak lassítja a nyitást, de nem akadályozza meg.

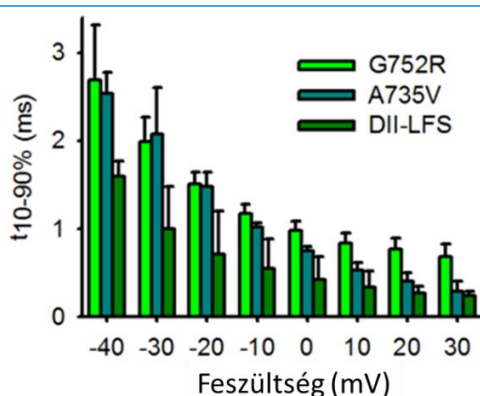
Az A735V-vel szemben a G752R mutáns csak kis mértékben változtatta meg az F-V és SSI F-V görbék középpontját és meredekségét, de drámaian lelassította a DII-VSD aktivációját (63. ábra). Depolarizáló impulzus hatására a DII-VSD aktivációja a mutánsban mintegy 7-szer lassabb, mint a DII-LFS csatornában ( $t_{10-90\%C}=0,99\pm0,08$  ms és  $6,96\pm0,51$  ms,  $+40$  mV-nál,  $n=8$ ,  $p<0,001$ ). Az ionáram aktivációs kinetikája is szignifikánsan lassult a G752R mutánsban: a  $-40$  –  $+30$  mV feszültségtartományban a nyitási kinetika  $1,7$  –  $2,9$ -szer bizonyult lassabbnak, mint a DII-LFS csatornánál ( $t_{10-90\%}=1,51\pm0,06$  ms és  $0,71\pm0,11$  ms  $-20$  mV-nál,  $p<0,001$ ; 64. ábra). E megfigyeléseinket megerősítettük emlős sejteken is: HEK293T sejtvonalon expresszáltatva mindkét mutáns lassabb aktivációs kinetikát mutatott a DII-LFS-hez képest.



**63. ábra DII-LFS-A735V és DII-LFS-G752R Brugada-szindrómás mutánsok**

A  $Na^+$  áramokat (A és D felső panelek) és a fluoreszcenciás jeleket (A és D alsó panelek) A735V (bal panelek) és G752R (jobb panelek) mutáns csatornákon mértük a DII-LFS háttéren.  $50$  ms hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk  $-140$ -tól  $+60$  mV-ig  $20$  mV-os lépésekben. Az átláthatóság kedvéért csak minden harmadik görbét ábrázoltuk. (B) és (E) A DII VSD aktivációs kinetikája a mutáns csatornában (zöld) és a DII-LFS konstruktban (fekete)  $+40$  mV-nál. (C) és (F) G-V (fekete körök) és SSI (fekete négyzetek) valamint a megfelelő F-V és SSI F-V görbék (zöld körök és négyzetek). Az SSI és SSI F-V görbéket a 62. ábránál ismertetett protokollal vettük fel. A pontozott vonalak a DII-LFS megfelelő görbéit mutatják.





**64. ábra** Az ionáram aktivációs kinetikája a DII-LFS és a Brugada-szindrómás mutáns konstruktokon

A  $\text{Na}^+$  áramok aktivációs kinetikájának jellemzéséhez a  $t_{10-90\%}$  értékeket határoztuk meg (az amplitúdó 10 és 90 %-a között eltelt időt az áram aktivációja során)  $-120$  mV-os feszültségről a jelölt tesztfeszültségekre váltást követően. Az értékeket meghatároztuk DII-LFS-G752R (zöld) és DII-LFS-A735V (kék) Brugada-szindrómás mutánsokon, és a DII-LFS csatornához hasonlítottuk (barna).

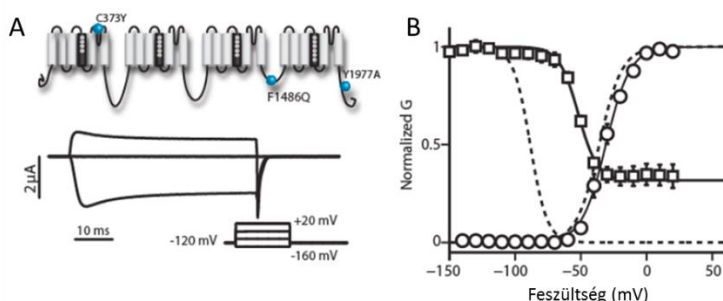
### 5.3.2 A DIII- és DIV-VSD szerepe az inaktivációban, az inaktivációs mechanizmus modellje

Mivel az irodalmi adatok, és saját, fentebb ismertetett eredményeink azt mutatták, hogy a szív  $\text{Nav}$  csatornájában az inaktiváció mechanizmusa a vázizom csatornától eltérő módon történhet, és a DIII-VSD-nek fontos, eddig nem leírt szerepe lehet az inaktiváció, illetve az abból való visszatérés folyamatában az  $\text{Nav1.5}$ -ben, a továbbiakban ezt vizsgáltuk részletesen a VCF technika segítségével.

Kísérleteinkben olyan mutációkat alkalmaztunk, melyekről ismert volt, hogy gátolják az inaktiváció folyamatát. E mutációk a DIII-DIV összekötő régió, és a DIII és DIV S4-S5 összekötő régióiban helyezkedtek el. Az S4-S5 összekötő jelenti a közvetlen kapcsolatot a VSD és a pórus között az egyes doménekben, s így a VSD konformáció-változásainak továbbítójaként tekinthető a PD felé.

Elsőként az inaktivációs motívumot (részecskét), jelentő, a DIII-DIV összekötőn elhelyezkedő, IFM szekvenciát módosítottuk. Az irodalomból ismert, hogy az F1486Q (IQM) mutáció jelentősen gátolja az inaktivációt az  $\text{Nav1.5}$  csatornában (233). Eredményeink megerősítették ezt a megfigyelést: hosszú depolarizáló impulzusok alatt is csak kis mértékű inaktivációt tapasztaltunk, és az ebből konstruált SSI görbe is jelentősen, mintegy  $30$  mV-tal jobbra tolódott (65. ábra).

**65. ábra** Az IQM-LFS csatornák ionárama és feszültség-függése



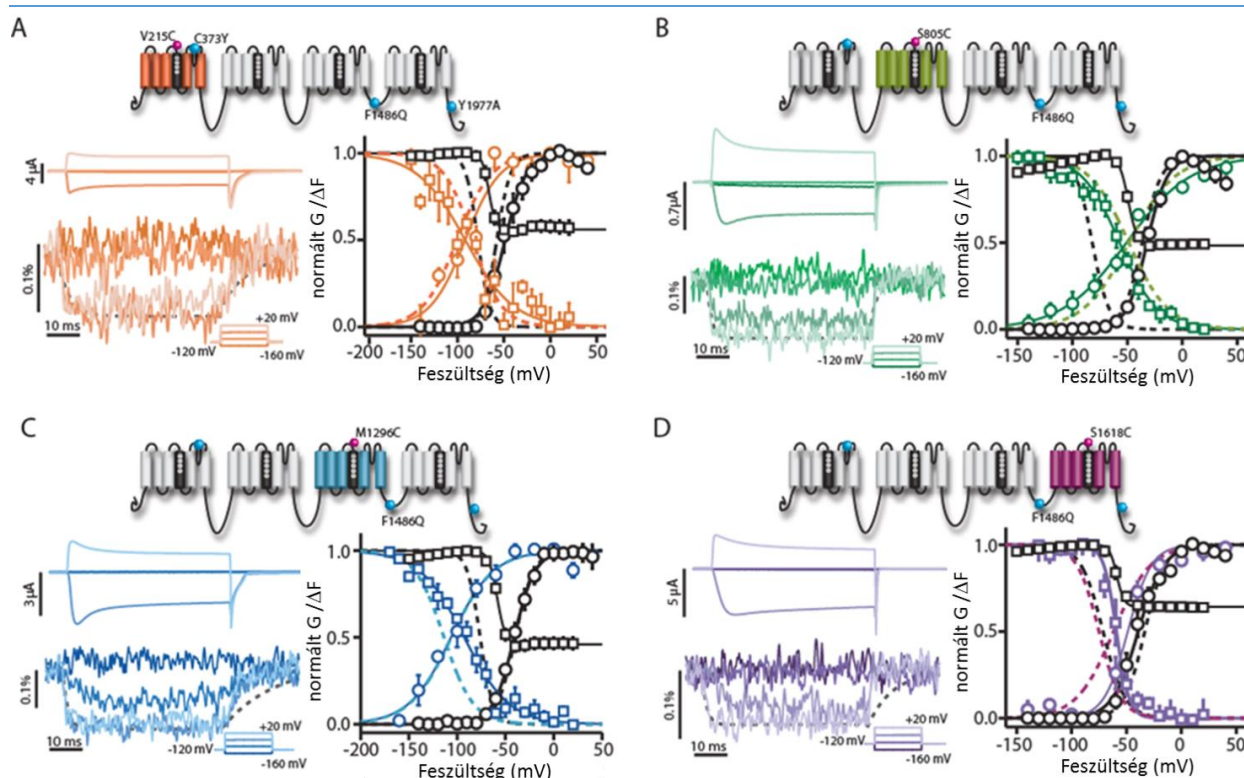
(A) A WT-LFS háttéren létrehozott F1486Q mutáció inaktiváció-deficiens csatornát hoz létre. Az áramokat  $50$  ms hosszú depolarizáló impulzusokkal váltottuk ki  $-160$  és  $+20$  mV között  $20$  mV-os lépésekben  $-120$  mV-ről. Az ábrán minden harmadik görbét tüntettük fel. (B) Az IQM-LFS csatorna G-V és SSI görbéje, melyet a korábban ismertetett protokollokkal vettünk fel. A pontozott vonalak a WT csatorna megfelelő görbéit mutatják.



A VSD-k mozgásának vizsgálatához a fluoreszcens mérésekhez alkalmas cisztein-mutáns hátterekben hoztuk létre az IQM mutációt. Korábbi eredményekkel összhangban az inaktiváció során nem immobilizálódó DI- és DII-VSD-k FV és SSI-FV görbéi csak kis mértékben és egymással párhuzamosan tolódtak el, annak ellenére, hogy a SSI görbén itt is jelentkezett a nagymértékű jobbra tolódás (66. ábra). A görbék párhuzamos eltolódása a VSD-k immobilizációjának, azaz a mélyebb inaktivációs állapotok betöltésének, hiányára utal a DI és DII esetében. Ezek alapján e két domén VSD-je nem játszik szerepet az inaktivációban.

A DIII-VSD esetén a vad-típusú csatornánál 50% alatt metszették egymást az FV és SSI-FV görbék, valamint növekvő depolarizációs hosszal lassult a VSD visszatérése hiperpolarizáció során, melyek a DIII-VSD inaktiváció miatt kialakult immobilizációját jelzik. Az IQM mutáció hatására az SSI-FV görbe jelentős jobbra tolódása volt megfigyelhető az FV görbe változatlansága mellett, ami a metszéspont 50% környékére történő emelkedését okozta, jelezve a mély inaktivált állapotok betöltöttségének csökkenését illetve megszűnését (66. ábra). Ugyanerre utal a DIII-VSD deaktiváció hosszú depolarizációkat követő lassulásának megszűnése (67. ábra). E megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a mutáció hatására az inaktivációs motívum erősen csökkent affinitással képes modulálni a DIII-VSD mozgását és immobilizációját indukálni.

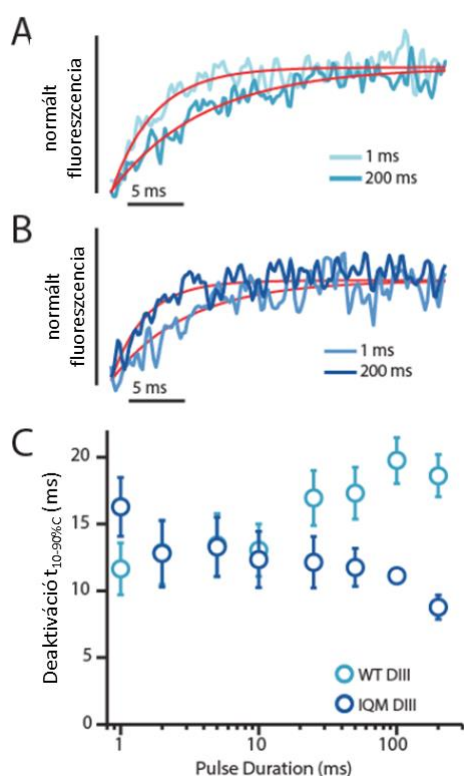
Az FV és SSI-FV görbék párhuzamos jobbra tolódását okozta az IQM mutáció a DIV-VSD esetén, így nem változott a két görbe egymáshoz képesti viszonya, azaz nem jelentek meg immobilizációt okozó mélyebb állapotok. A DIV-VSD deaktivációs kinetikája az IQM hatására lényegesen felgyorsult, ami arra utal, hogy az IFM motívum a vad-típusban a DIV-VSD-vel kölcsönhatva stabilizálja annak aktivált állapotát (66 D. ábra bal alsó panel, színes folytonos vonal és szaggatott vonal), míg e kölcsönhatás a mutánsban sérül.



**66. ábra** A *DI-DIV-IQM* mutánsok áramainak és fluoreszcenciás jeleinek egyensúlyi és kinetikai tulajdonságai

(Bal panelek) A  $\text{Na}^+$  áramokat és a fluoreszcenciás jelet a DI- (A), DII- (B), DIII- (C), DIV-LFS (D) csatornák inaktiváció-deficiens IQM mutánsain rögzítettük. Az ionáramokat (bal fent) és a fluoreszcenciás jelet (bal lent) -160 és +20 mV között rögzítettük 20 mV-os lépésekben, és minden harmadik görbét ábrázoltunk az átláthatóság kedvéért. A pontozott vonalak a fluoreszcencia jelet mutatják a DI-DIV-LFS csatornákon +20 mV feszültségnél. (Jobb panelek) A G-V (fekete kör), SSI (fekete négyzet), FV (színes kör) és SSI F-V (színes négyzet) görbékét a korábban ismertetett protokollokkal vettük fel. A szaggatott vonalak a DI-DIV-LFS csatornák megfelelő görbéit mutatják.

A továbbiakban a DIII S4-S5 összekötőjében található DIII-N1325S LQT3-mutáns csatornát vizsgáltuk, melyről kimutatták, hogy megnöveli a késői  $\text{Na}^+$  áramot (234), amit N1325S transzgén egerekben is megfigyeltek (235). A korábbi eredményekkel egyezően a mutáció a GV görbe erős balra tolódását okozta az SSI kis mértékű változtatása mellett, valamint hasonlóan balra tolta az FV görbét, de nem befolyásolta az SSI-FV görbét. A fentebb említettek alapján a két fluoreszcenciás görbe viszonyának e változása arra utal, hogy a mutánsban csökkent a mélyebb inaktivált állapotok DIII-VSD általi betöltöttsége a DIII-LFS-hez képest. Mivel az N1325S csak az FV, az IQM pedig csak az SSI-FV görbét módosította, valószínűsíthető, hogy mindkét mutáció az DIII-VSD –IFM kölcsönhatást gyengíti, de más-más átmenetekre hatva.



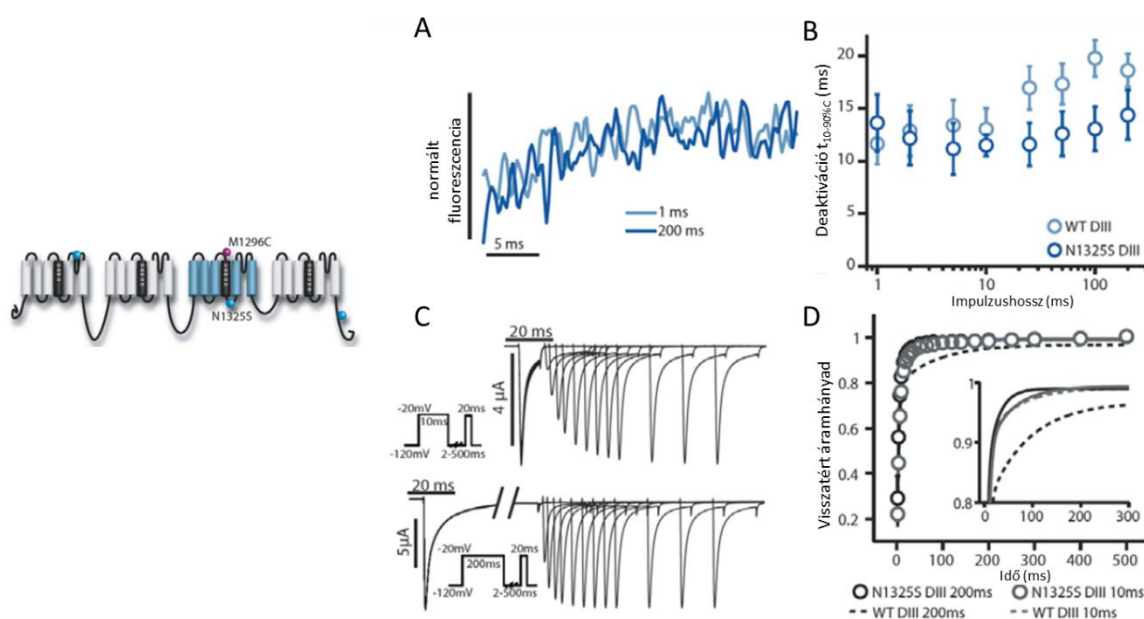
**67. ábra A DIII-VSD deaktiváció kinetikája WT és IQM mutáns csatornáknál.**

(A) Fluoreszcenciás jelek a DIII-LFS csatornából, melyeket 1 ms (világoskék) vagy 200 ms (sötétkék) hosszúságú +50 mV-os depolarizáló impulzusokat követően -120 mV-ra visszatérve rögzítettünk. A piros vonalak az illesztett exponenciális függvényeket mutatják, melyek időállandói ennél a sejtben 3,83 és 8,28 ms voltak 1 illetve 200 ms-os depolarizációt követően.

(B) Az (A) panellel azonos mérések a DIII-IQM csatornán. Az illesztésből származó időállandók 10,91 és 5,03 ms voltak 1 illetve 200 ms-os depolarizációt követően. Figyelemre méltó, hogy a visszatérési sebességek felcserélődtek az (A) panelhez képest.

(C) 1 - 200 ms hosszúságú +50 mV-os depolarizációt követően -120 mV-ra állítottuk a feszültséget, és rögzítettük a deaktiválódó VSD fluoreszcencia jelét. Az ezekre illesztett exponenciális függvények időállandójából számolt  $\tau_{10-90\%,C}$  értékeket ábrázoltuk a DIII-LFS (világoskék) és a DIII-IQM (sötétkék) csatornákra.

Tovább vizsgáltuk a DIII-VSD és az inaktiváció kapcsolatát, melynek során az ionáram inaktivációból való visszatérésének kinetikáját mértük 10 és 200 ms-os depolarizáló impulzusokat követően. Szembetűnő különbséget találtunk a WT és az N1325S között: a mutáns csatornánál eltűnt a visszatérés lassú komponense (68. ábra). A WT csatornánál a visszatérés lényegesen lassabb 200 ms-os depolarizáció után, mint 10 ms után, ami valószínűleg a hosszú impulzus alatt benépesített mélyebb inaktivált állapotoknak tudható be. Ezzel szemben, az N1325S csatornánál a visszatérés sebessége azonos volt 10 és 200 ms után, mutatva, hogy a mutáció megszüntette a mély inaktivált állapot betöltöttségét. Az ionáram visszatérésének sebességével együtt a DIII-VSD deaktivációs kinetikája is azonos volt 10 és 200 ms depolarizációt követően.



### 68. ábra Fluoreszcenciás jelek és ionáramok a DIII-N1325S LQT3 mutáns csatornákból.

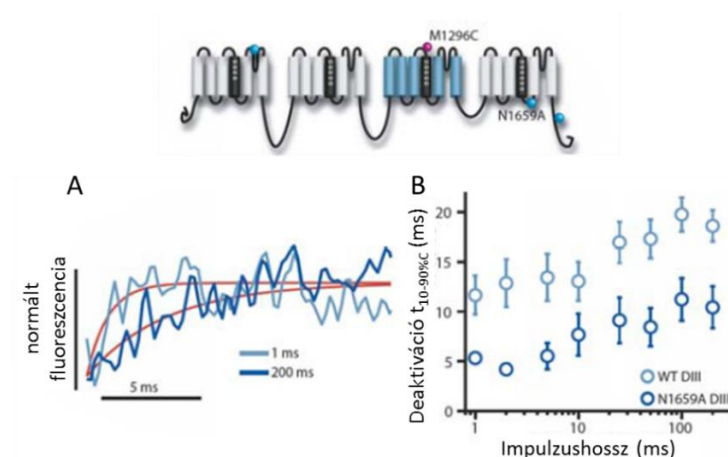
(A) DIII-N1325S fluoreszcenciás jelek -120 mV-os membránpotenciálnál, melyeket 1 (világoskék) vagy 200 ms (sötétkék) hosszúságú +50 mV-os depolarizáció előzött meg. (B) A fluoreszcenciás jelek deaktivációját 1-200 ms időtartamú +50 mV-ra történő depolarizációt követően mértük -120 mV-os feszültségen DIII-LFS WT (világoskék) és DIII-N1325S (sötétkék) csatornákon. (C) Ionáramok DIII-N1325S csatornákból dupla impulzusos protokollal. Az első -20 mV-os depolarizáló impulzus 10 (felül) vagy 200 ms-ig (alul) tartott, majd visszatértünk -120 mV-ra különböző időtartamokra a 2-500 ms tartományban, amit egy újabb -20 mV-os depolarizáció követett. (D) Az áram visszatérésének időfüggése DIII-N1325S csatornákon 10 (szürke) vagy 200 ms (fekete) depolarizáló impulzusok után. A betétabbra a visszatérés időfüggésére illesztett görbéket mutatja folytonos vonalakkal, míg a szaggatott vonalak a DIII-LFS csatorna görbéit mutatják.

A DIV-VSD inaktivációban betöltött szerepének további vizsgálatához a DIV S4-S5 összekötőjében található N1659A mutáns csatornával végeztünk kísérleteket, mely pozícióról feltételezhető, hogy kölcsönhat az inaktivációs IFM motívummal (236). A mutációt létrehoztuk mind a DIII-LFS, mind a DIV-LFS konstrukciókban.

Az IQM mutánshoz hasonlóan a DIII-N1659A csatorna árama is erősen csökkent inaktivációt mutatott és SSI-FV görbéje is jelentősen pozitív irányba tolódott. A DIII-VSD deaktivációja szignifikánsan felgyorsult, ami arra utalhat, hogy a DIII-VSD deaktivációja függ a DIV-VSD konformációjától. A DIII-hoz hasonlóan, de a DIII-IQM mutánssal ellentétben, a

DIII-N1659A deaktivációja lassul hosszú depolarizáló pulzusokat követően, ami azt jelzi, hogy a DIII-VSD továbbra is kölcsönhat a DIII-DIV összekötővel (69. ábra).

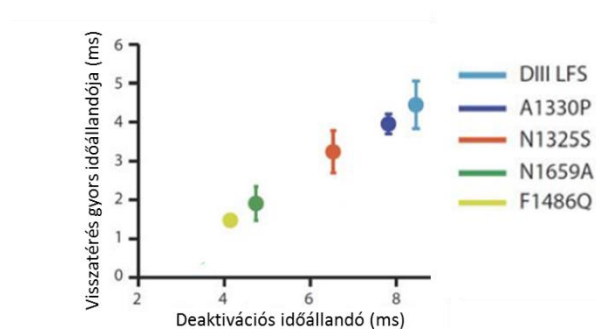
Az IQM és a DIV-N1659A mutánsokban hasonlóképpen jobbra tolódott a DIV FV görbe és felgyorsult a DIV-VSD deaktiváció, ami alátámasztja a DIV-VSD és a DIII-DIV összekötő közvetlen kölcsönhatását.



**69. ábra Fluoreszcenciás jelek a DIII-N1659A mutáns csatornákból.**

(A) DIII-N1659A fluoreszcenciás jelek -120 mV-os membránpotenciálnál, melyeket 1 (világoskék) vagy 200 ms (sötétkék) hosszúságú +50 mV-os depolarizáció előzött meg. (B) A fluoreszcenciás jelek deaktivációját 1-200 ms időtartamú +50 mV-ra történő depolarizációt követően mértük -120 mV-os feszültségen DIII-LFS WT (világoskék) és DIII-N1659A (sötétkék) csatornákon.

A fenti kísérletek eredményei alapján megfigyeltük, hogy szoros korreláció áll fent az áram inaktivációból való visszatérésének (az amplitúdó túlnyomó részét kitevő) gyors komponense és a DIII-VSD deaktivációs sebessége között 200 ms-os impulzusok után, de nem 10 ms-os impulzusok után (70. ábra). Ez a szoros összefüggés arra utal, hogy a DIII-VSD meghatározó szerepet játszik az inaktivációból való visszatérésben hosszabb, a szív akciós potenciáljának megfelelő időtartamú, depolarizációkat követően.



**70. ábra A DIII-VSD deaktivációs kinetikájának és az áram inaktivációból való visszatérésének összehasonlítása.**

Erős korreláció figyelhető meg az egyes csatornákon mérhető DIII-VSD deaktivációs kinetika és az áram inaktivációból való visszatérésének kinetikája között. A vízszintes tengelyen a DIII-VSD 200 ms hosszú depolarizációt követő deaktiváció fluoreszcenciás jelére illesztett függvény időállandóját, míg a függőleges tengelyen az áram visszatérését jellemző két-exponenciális függvény nagyobb súlyú, gyors időállandóját ábrázoltuk.

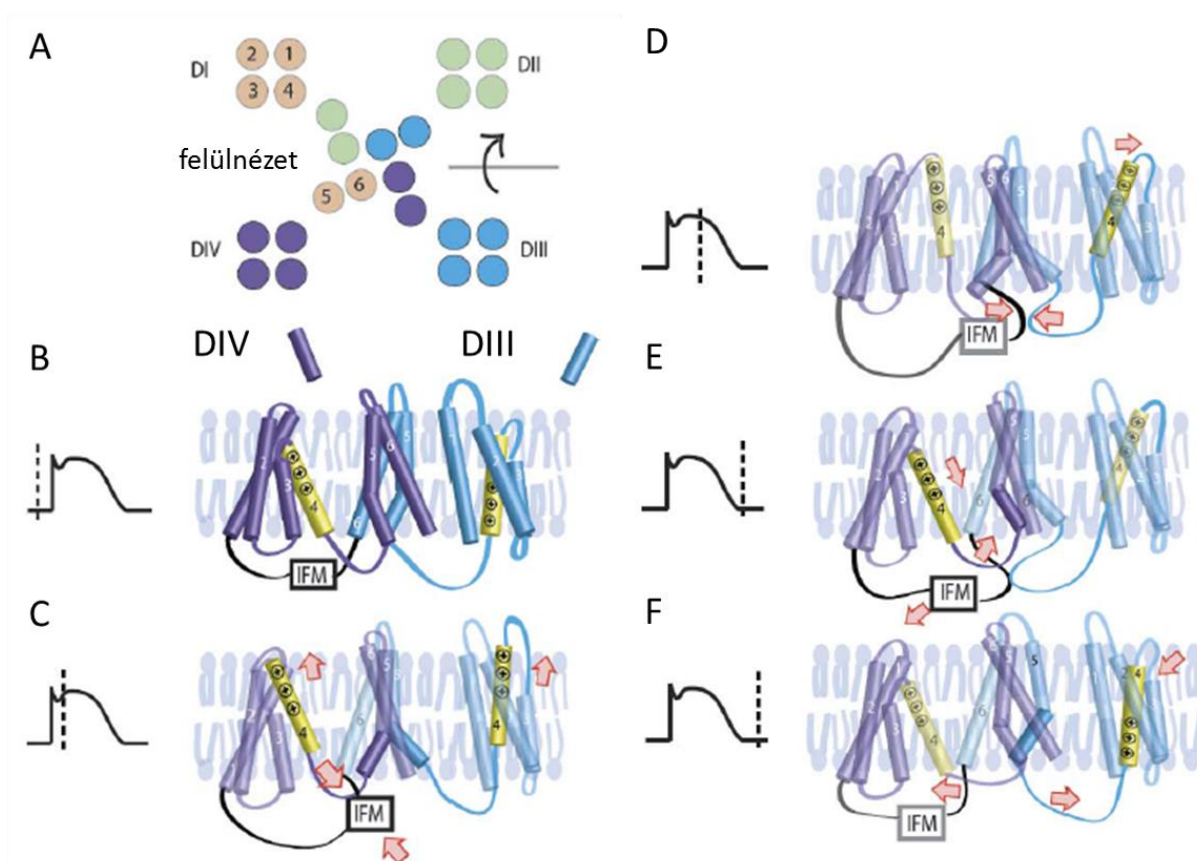


Kísérleti eredményeink alapján felállítottunk egy modellt, mely a jelenleg széles körben elfogadott inaktivációs modell továbbfejlesztése, elsősorban az eddig figyelmen kívül hagyott DIII-VSD szerepének hangsúlyozásával (182). A depolarizáció elején a DI-DIII VSD-k gyorsan aktiválódnak, nyitják a csatornát, melyet késleltetve követ a DIV-VSD aktivációja (71. ábra). A DIV-VSD aktivált konformációja lehetővé teszi a DIII-DIV összekötőn található IFM motívum kötődését a DIV-VSD-hez, mellyel egyúttal elzárja a pórust, és megakadályozza a  $\text{Na}^+$  ionok áramlását. A szív akciós potenciáljának hosszához mérhető, >100 ms hosszúságú depolarizációk esetén az IFM kölcsönhatásba lép a DIII-VSD-vel is, így stabilizálva mindkét VSD aktivált állapotát. Repolarizáció során az IFM először a DIV-VSD-től válik el, lehetővé téve annak visszatérését a nyugalmi állapotba, majd jóval később a DIII-VSD-től, melynek visszatérését jellemző deaktivációs kinetika lassabb, mint a DIV-é, és a depolarizáció hosszától függ.

A modell alapján megfigyeléseink a következők szerint magyarázhatók. Az IQM mutáció akadályozza az inaktivációs motívum kölcsönhatását mind a DIII-, mind a DIV-VSD-vel, így sérül az inaktiváció, és mindkét VSD deaktivációs kinetikája gyorsul, de a DIII-VSD esetében csak hosszú depolarizációk után, mivel csak ilyenkor alakul ki a kölcsönhatás. Az DIV összekötőben levő N1659A mutáció gátolja az IFM kötődését a DIV-VSD-hez, így annak deaktivációja gyorsabb lesz. A DIII-VSD visszatérése is lényegesen gyorsabb lesz, viszont az időfüggő kölcsönhatás továbbra is kialakulhat, amit a depolarizáció hosszától függő deaktivációs kinetika megmaradása jelez. A DIII-VSD-ben levő N1325S mutáció akadályozza az IFM - DIII-VSD kötődést, így megszűnik a DIII-VSD deaktivációjának impulzushosszfüggése, valamint az áram inaktivációból való visszatérése is gyorsabb és egy komponensű lesz.

Összességében modellünk szerint a szív akciós potenciál alatt a DIV-VSD határozza meg az inaktiváció kialakulását, míg a DIII-VSD szabályozza az abból történő visszatérést. Ezek alapján a DIII-VSD fogja meghatározni a rendelkezésre álló  $\text{Na}^+$  csatornák számát az akciós potenciált követően, s ezáltal kontrollálni a refrakter periódus hosszát, ami egy kritikus meghatározója az aritmiák kialakulásának (237).





**71. ábra A DIII-VSD és DIV-VSD inaktivációban betöltött szerepének modellje.**

(A) A csatorna doménjeinek és azon belül a transzmembrán hélixek elrendezése az extracelluláris oldalról „felülnézeti” képen. (B-F) A DIII- és DIV-VSD mozgása az inaktiváció kialakulása és az abból való visszatérés során. A bal oldali betétábrán a szaggatott vonal jelzi a szív akciós potenciáljának aktuális fázisát. (B) Nyugalmi potenciálon a DIII- és DIV-VSD-k a nyugalmi állapotban vannak, és a DIII-DIV összekötőn az IFM motívum nem-kötött állapotban van. (C) Depolarizáció során a DIII- és DIV-VSD-k aktiválódnak 10 ms-on belül, elősegítve a DIII-DIV összekötő és a DIV-VSD közötti kölcsönhatást, inaktiválva a csatornát. (D) ~100 ms után a DIII-DIV összekötő IFM-függő módon kölcsönhatásba lép a DIII-VSD-vel is, stabilizálva annak aktivált konformációját. (E) A nyugalmi potenciálra visszatérve a DIII-DIV összekötő először a DIV-VSD-ről disszociál. (F) Később a DIII-DIV összekötő a DIII-VSD-ről is disszociál, lehetővé téve az inaktivációból való visszatérést.

## 5.4 A Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) technika meghonosítása

Az előző fejezetben ismertett, a hNav1.5 csatornára vonatkozó eredmények jól illusztrálják a VCF technikával megszerezhető adatokat és az azokból levonható következtetéseket. Mivel kutatási irányainkat bővíteni kívántuk „elektromosan néma”, azaz áramot nem vezető, de mégis feszültség-érzékeny fehérjék vizsgálatának irányába, valamint kihasználni ezt az ioncsatornákról is több információt nyújtó módszert, vezetéssel létrehoztunk egy VCF laboratóriumot. A Nemzeti Agykutatási Program keretén belül elnyert támogatással megalakítottuk az MTA-DE NAP B „Ionsatorna funkcionális szerkezetvizsgáló laboratóriumot” a DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai intézetében.

A laboratórium 2015. évi létrehozását követően beüzemeltük a VCF mérőállomást a szükséges kiegészítő berendezésekkel és eszközökkel együtt, mint például a mikroinjektor, sejtinkubátor, gél-futtató és megvilágító. Optimalizáltuk a technikához szükséges protokollokat, úgy, mint cisztein mutáns csatornák előállítása, RNS készítés és sejtinjektálás. A létrejött kutatási infrastruktúra felhasználásával a következő, a feszültség-érzékeny fehérjék kapuzásával / konformáció-változásaival kapcsolatos struktúra-funkció vizsgálatokat végezzük:

1. Vizsgáljuk, hogy hogyan hat a membránban a koleszterin és analógjai szintjének változása a  $K_v$  csatornák kapuzására, és hogy a csatorna melyik doménje a hatások elsődleges célpontja. Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy a koleszterin és a 7-dehidrokoleszterin szintjének változása a humán limfociták és sejtvonalak membránjában erősen befolyásolja a  $K_v1.3$  ionsatorna kapuzásának mind feszültség-függő egyensúlyi, mind kinetikai paramétereit. A VCF technikával azt kívánjuk meghatározni, hogy a hatás a VSD-n vagy a pórus doménen keresztül nyilvánul-e meg, és ezáltal a hatásmechanizmust próbáljuk megérteni. Vizsgálni kívánjuk a szterolok különböző VSD-PD csatolású  $K_v$  csatornák kapuzására gyakorolt hatását, és ezáltal a szterol-hatás csatorna-specificitását.

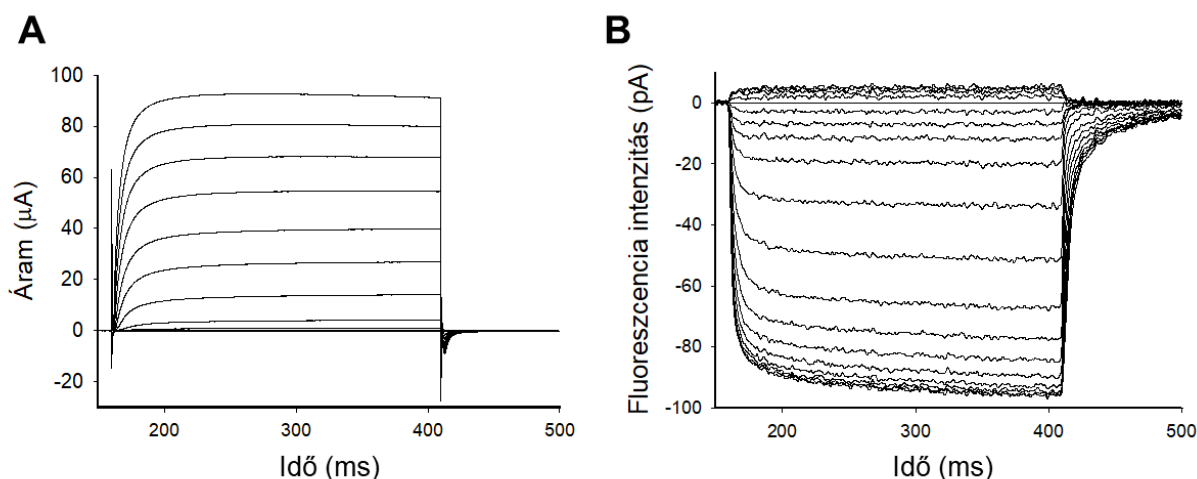
2. Szekvencia homológia alapján azonosítottak egy fehérjét, mely a feszültség-függő ioncsatornák VSD-jéhez hasonló szerkezetű, de ionok átjutását biztosító PD-nel nem rendelkezik. Munkacsoportunk egyik tagja, Papp Ferenc, az NIH laboratóriumában kezdte meg ennek az NVS-nek (Novel Voltage Sensor) nevezett molekulának a vizsgálatát VCF-fel, és ez a projekt folytatódik új laboratóriumunkban is. Célunk bizonyítani az NVS valódi feszültség-

érzékelő funkcióját, és felderíteni szerepét a sejt működésében. Előzetes eredmények alapján a membránpotenciál változásait közvetítheti intracelluláris jelátviteli útvonalak felé.

3. Vizsgáljuk az agyban és a humán tumorok nagy hányadában előforduló Kv10.1 ioncsatorna szerkezetét és kapuzását. A csatorna közelmúltban publikált krio-EM szerkezete számos, a konvencionálistól eltérő elemet tárt fel, és német kollaborátoraink munkája alapján kapuzásának vizsgálata is váratlan felfedezéseket eredményezett. Kísérleteinkben a szerkezet alapján alkotott predikciókat kívánjuk kísérletesen ellenőrizni, illetve a nem-konvencionális kapuzási elemek részleteit feltárni. Ehhez a VCF technikán felül bevezettük a laborban új technikaként a SCAM (substituted cysteine accessibility method) módszert, melynek során a fehérje célzott aminosav pozíciójában egy cisztein helyettesítést létrehozva metántioszulfonát (MTS) reagensekkel vizsgáljuk annak a vizes oldatok felőli hozzáférhetőségét a fehérje különböző konformációs állapotaiban.

#### 5.4.1 A membrán koleszterin tartalmának hatása Kv csatornák kapuzására

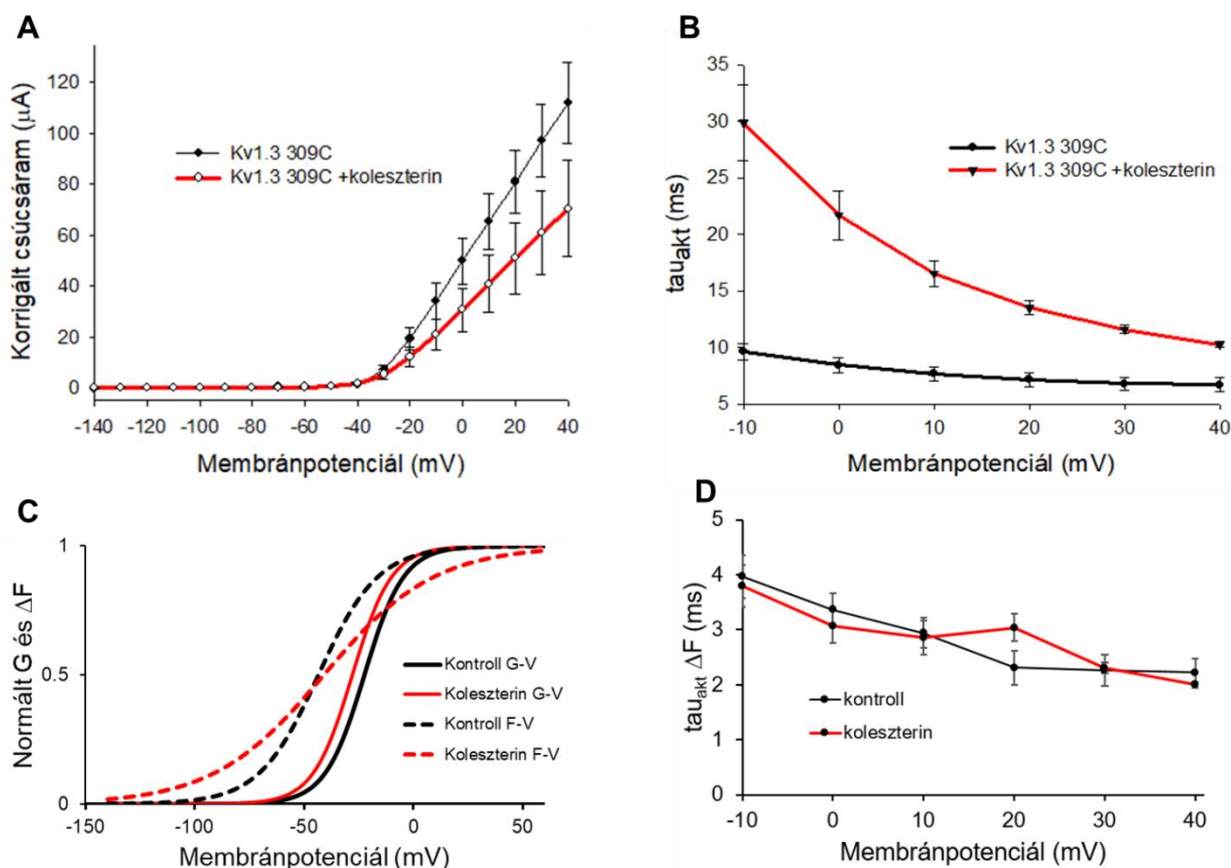
Bár a fent felsorolt kutatási projektek még jelenleg is folyamatban vannak, röviden bemutatok előzetes kvalitatív eredményeket az első témából. Korábbi, emlős sejteken végzett méréseinkkel egyezően, az oocitákban kifejeztetett Kv1.3 csatornák amplitúdója is csökkent a membrán koleszterin tartalmának növelése hatására, valamint lassult az áramok aktivációs kinetikája. Mivel az ionáram a pórus állapotáról informál, a koleszterin nyilvánvalóan hatást fejt ki a pórusra. Ez viszont történhet közvetlenül a póruson, de közvetve a VSD-re kifejtett hatáson keresztül is. Előfordulhat tehát, hogy a pórus nyitása azért lassul le, mert a koleszterin feldúsulása lassítja az azt megelőző VSD mozgást, és a PD lassú nyitása ennek csak következménye. Mivel VCF-fel mérhetjük a VSD feszültség-függésének és kinetikájának változását is koleszterin hatására, és ezt összevethetjük a póruson tapasztalt változásokkal, választ kaphatunk erre a kérdésre. E célból létrehoztuk a Kv1.3 csatorna A309C mutánsát, hogy a VSD közelében a VCF-hez szükséges fluorofórt a csatornához kapcsolhassuk (72. ábra).



**72. ábra A Kv1.3-A309C csatorna árama és fluoreszcenciás jele**

(A) *Xenopus* oocitákban kifejezett Kv1.3-A309C csatornákon átfolyó  $\text{K}^+$  áramok, melyeket -140 és +40 mV közötti 250 ms hosszúságú depolarizáló impulzusokkal váltottunk ki 10 mV-os lépésekben. (B) Ugyanezen a sejten párhuzamosan mért fluoreszcenciás jelek, melyek a 309-as pozíciójú ciszteinhez kapcsolt TAMRA festékből származnak.

Eredményeink azt mutatják, hogy míg a koleszterin töltés a PD-t jellemző G-V görbék középpontjának eltolódását eredményezte a meredekség változatlansága mellett, addig az F-V görbék középpontja nem változott, de meredeksége jelentősen lecsökkent (73. ábra). Emellett az áram aktivációs kinetikájának koleszterin töltés hatására megfigyelt jelentős lassulásával szemben a VSD mozgását jellemző fluoreszcenciás jelek kinetikája nem változott a töltés hatására. Ezek alapján a koleszterin dúsítása VSD-PD csatolás gyengülését okozta: a VSD mozgásában nem látszik jelentős energetikai változás, míg a PD mozgásában igen. A két domén mozgásának eltérő változása tehát arra utal, hogy a PD kevésbé szorosan követi a VSD aktivációját kezelés hatására. Sőt, pozitív membránpotenciáloknál megfigyelhető a kezelt sejteken, hogy míg a G-V görbe a maximális érték közelében van, addig az F-V még messze van a szaturációtól, azaz a pórus maximális nyitási valószínűsége létrejöhet a VSD teljes aktivációja nélkül. Ez a korábban említett Kv7.1 csatorna allosztérikus kapuzási sémájához hasonlít, illetve hasonló figyeltünk meg a Nav1.5 csatorna egyik Brugada-mutánsában is. Összességében tehát a koleszterin dúsítás elsősorban közvetlenül a pórusra hat, a VSD energetikáját jelentősen nem módosítva, és gyengíti a csatolást a két domén között.



**73. ábra** A koleszterin dúsítás hatása  $K_v1.3\text{-A309C}$  csatornák kapuzására

(A) *Xenopus* oocitákban kifejezett  $K_v1.3\text{-A309C}$  csatornákon átfolyó áram feszültség-függése kontroll (fekete) illetve koleszterinnel dúsított (piros) sejteken. (B) Az ionáramok aktivációs kinetikájára illesztett exponenciális függvények időállandói a membránpotenciál függvényében kontroll (fekete) és koleszterinnel kezelt (piros) sejteken. (C) A pórus nyitási valószínűségét jellemző normált vezetőképesség ( $G$ , folytonos vonal), és a VSD mozgását jellemző normált fluoreszcencia változás ( $\Delta F$ , szaggatott vonal) feszültség-függése kontroll és koleszterinnel dúsított sejteken. A görbék az adott csoportba tartozó sejtek adatainak átlagolásával meghatározott  $V_{1/2}$  és  $k$  értékekből számolt és konstruált Boltzmann-függvények. (D) A VSD mozgását jellemző fluoreszcenciás jel depolarizáció során mért aktivációs kinetikájára illesztett exponenciális függvény időállandója a membránpotenciál függvényében kontroll és koleszterinnel kezelt sejteken.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A feszültség-függő ioncsatornákkal kapcsolatos vizsgálatainkban az alábbiakat állapítottuk meg:

- A Shaker Kv csatornában a hiperpolarizációt követően az aktivációs kapu záródása minden esetben megelőzi a VSD visszatérését. Fiziológias körülmények között az aktivációs kapu minimális töltést hordozva, de igen gyorsan, és a permeáló ion fajtájától függő sebességgel záródik be, és a VSD visszatérése jóval lassabban ezt követően történik meg. Hosszú depolarizációt követően azonban az inaktiváció hatására a csatorna záródása lassúvá, s ezzel sebesség-meghatározóvá válik, ezáltal hátráltatva a VSD visszatérését a nyugalmi állapotba.
- Intracellulárisan a protonok gátolják a Kv csatornákat már fiziológias pH tartományban is, aminek élettani relevanciája is lehet. Az extracelluláris oldalról viszont csak jóval alacsonyabb pH tartományban befolyásolják az inaktiváció mechanizmusát, felgyorsítva azt. Ez a hatás mégis releváns lehet alacsony extracelluláris pH-jú, pl. gyulladásos területeken, mivel a töltés-árnyékolási effektussal együtt a csatornák aktivációját hátráltatva, inaktivációját pedig felgyorsítva lényegesen csökkentheti a  $K^+$  konduktanciát.
- Egy egyszerű modellel sikerült megmagyaráznunk a Kv1.3 csatorna szokatlan inaktivációs kinetika változását alacsony extracelluláris pH esetén: az alacsony pH-n protonált H399-es aminosav gátolja a  $K^+$  ionok mozgását mindkét irányba a pórus bejáratánál. Emiatt az alacsony pH hatása az inaktivációs kinetikára attól függ, hogy a kötőhely betöltődése elsősorban melyik oldalról történik az áramirány és  $K^+$  koncentráció függvényében.
- Több Kv1.3 csatornát gátló skorpió toxint azonosítottunk, melyek közül a legjobb tulajdonságú Vm24  $K_d = 2,9$  pM hatékonysággal gátol. Továbbá gátolja a T-sejtek  $Ca^{2+}$  jelét, proliferációját, CD25 expresszióját, valamint patkányokban gátolja a késői hiperszenzitívitási reakciót in vivo. A demonstrált tulajdonságok alapján a Vm24 az eddig ismert egyik legjobb tulajdonságú Kv1.3 csatorna gátlószer.
- Célzott mutációkkal sikerült az anurotoxin Kv1.3 iránti szelektivitását nagy mértékben javítani az affinitás megtartása mellett, s ezzel egy lényegesen jobb tulajdonságú toxint előállítani.



- Elsőként írtuk le a humán szívizom akciós potenciáljának alakításában kulcsszerepet játszó Nav1.5 csatorna feszültség-érzékelő doménjeinek feszültség-függését, aktivációs és deaktivációs kinetikáját és ezek függését az inaktiváció mértékétől a VCF technika segítségével. Megállapítottuk, hogy a VSD-k nagyon széles feszültség-tartományban aktiválódnak, és nem szükséges az összes VSD teljesen aktivált állapota a csatorna nyitásához.
- Karakterizáltuk két, Brugada-szindrómát okozó hNav1.5 mutáns defektív kapuzási mechanizmusát domén szinten.
- Tisztáztuk a DIII- és DIV-VSD-k eddig ellentmondásos szerepét az Nav1.5 inaktivációjában. Megállapítottuk, hogy a szív akciós potenciáljának időtartományában elsősorban a DIII-VSD határozza meg az inaktivációból való visszatérés kinetikáját, és felállítottunk egy modellt az inaktiváció kialakulásának és az abból való visszatérésnek a mechanizmusáról.
- Létrehoztuk vezetésemmel az MTA-DE NAP B „Ioncsatorna funkcionális szerkezetvizsgáló laboratóriumot” a DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai intézetében. A létrejött kutatási infrastruktúra felhasználásával a feszültség-kapuzott  $K^+$  csatornák doménjeinek izolált mozgását, ill. a domének közötti kommunikációt vizsgáljuk a feszültség-zár fluorometria módszerrel elsőként az országban.

## 7. GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Figyelembe véve, hogy a feszültség-függő  $K^+$  csatornák az emberi szervezet szinte minden sejtjében jelen vannak, és a membránpotenciálon keresztül kihatnak a sejtfunkciók széles skálájára, nem kérdéses, hogy a  $K_v$  csatornák kapuzását befolyásoló tényezők megértése túlmutat a molekula működésének egyszerű biofizikai leírásán. A kóros folyamatokban előforduló lokális ionkoncentráció vagy pH változások nagy mértékben módosíthatják a  $K_v$  csatornák kapuzását, melyek részben magyarázhatják például az ilyen területen működő idegsejtek tüzelési válaszában, vagy az immunsejtek proliferációs képességében beállt változásokat. A mechanizmusok részletes ismerete megteremtheti a lehetőségét a későbbi farmakológiai beavatkozásoknak.

A T-sejtek  $K_v1.3$  ioncsatornájának nagy affinitású és szelektív peptid toxin gátlószerei kiinduló molekulaként funkcionálhatnak bizonyos autoimmun betegségek kezelésére fejlesztendő gyógyszerek számára. *In vivo* állatkísérletek már bizonyították az ilyen toxinokból fejlesztett, de kémiaiilag stabilabbá tett és csökkentett immunogenecitású molekulák hatékonyságát a T-sejt mediált autoimmun kórképek tüneteinek enyhítésében.

A humán szívizom  $Na_v1.5$  csatornája indítja el a szív akciós potenciálját, ezért hibás működése aritmiákat, és így hirtelen halálhoz vezető betegségeket okozhat. Ennek megfelelően farmakológiai célpontként is jelentős. A hatékony és szelektív gyógyszerek fejlesztéséhez nélkülözhetetlen a csatorna kapuzásának domén szintű ismerete, hiszen a  $Na^+$  csatorna természeténél fogva az egyes domének egyedi tulajdonságokkal bírnak, eltérően funkcionálnak és a farmakológiai ágensekkel is eltérően hatnak kölcsön. A betegségekre specifikus gyógyszerek kifejlesztéséhez pedig az aritmogén mutációk kapuzásának a vad-típushoz viszonyított eltéréseit szükséges megérteni szintén a domének szintjén, melyhez a VCF technika értékes információkkal szolgál.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hille B. Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.; 1992.
2. Chandy KG, Decoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*. 1984;160:369-85.
3. Lang F, Shumilina E, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contributions to nephrology*. 2006;152:142-60.
4. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stuhmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2014;369(1638):20130094.
5. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. 1984;312(5993):446-8.
6. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology (London)*. 1952;117:500-44.
7. Varga Z, Bartok A, Panyi G, Zakany R, Juhasz T, Matta C, et al., editors. Voltage-Gated Ion Channels are Involved in the Signaling Pathway of Differentiating Chondrocytes. US Biophysical Society Annual Meeting; 2011 05/03/2011-05/09/2011; Baltimore, MD, USA: Biophysical Journal.
8. Alexander SP, Catterall WA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br J Pharmacol*. 2015;172(24):5904-41.
9. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol*. 1995;106(5):923-55.
10. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010;90(1):291-366.
11. Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport*. 1994;5(18):2501-5.
12. Fang Y, Schram G, Romanenko VG, Shi C, Conti L, Vandenberg CA, et al. Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(5):C1134-44.
13. Pruss H, Derst C, Lommel R, Veh RW. Differential distribution of individual subunits of strongly inwardly rectifying potassium channels (Kir2 family) in rat brain. *Brain research Molecular brain research*. 2005;139(1):63-79.

14. Mi H, Deerinck TJ, Jones M, Ellisman MH, Schwarz TL. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels that may participate in K<sup>+</sup> buffering are localized in microvilli of Schwann cells. *J Neurosci.* 1996;16(8):2421-9.
15. Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev.* 2005;85(1):319-71.
16. Dascal N. Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal.* 1997;9(8):551-73.
17. Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2010;48(1):45-54.
18. Karschin C, Dissmann E, Stuhmer W, Karschin A. IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci.* 1996;16(11):3559-70.
19. Clement JPt, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, et al. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron.* 1997;18(5):827-38.
20. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Progress in biophysics and molecular biology.* 1989;54(2):87-143.
21. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res.* 1992;70(2):223-33.
22. Ando M, Takeuchi S. Immunological identification of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell and tissue research.* 1999;298(1):179-83.
23. Newman EA. Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature.* 1984;309(5964):155-7.
24. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 2010;90(2):559-605.
25. Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci.* 2001;21(19):7491-505.
26. Czirjak G, Toth ZE, Enyedi P. The two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18550-8.
27. Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, et al. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nature medicine.* 2010;16(10):1157-60.
28. Christensen AH, Chatelain FC, Huttner IG, Olesen MS, Soka M, Feliciangeli S, et al. The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2016;97:24-35.
29. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, et al. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J.* 1996;15(5):1004-11.

30. Kaczmarek LKA, R.; Chandy, G.K.; Grissmer, S.; Wei, A.D.; Wulff, H.; Gutman, G.A. Calcium-activated potassium channels. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. 2016.
31. Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel in vascular smooth muscle: relationship between  $\text{K}(\text{Ca})$  channel diversity and smooth muscle cell function. *Circ Res.* 1999;85(9):e33-43.
32. Vandorpe DH, Shmukler BE, Jiang L, Lim B, Maylie J, Adelman JP, et al. cDNA cloning and functional characterization of the mouse  $\text{Ca}^{2+}$ -gated  $\text{K}^{+}$  channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J Biol Chem.* 1998;273(34):21542-53.
33. Pena TL, Chen SH, Konieczny SF, Rane SG. Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast  $\text{KCa}$  channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13677-82.
34. Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *Journal of General Physiology.* 1993;102:601-30.
35. Wulff H, Castle NA. Therapeutic potential of  $\text{KCa}3.1$  blockers: recent advances and promising trends. *Expert review of clinical pharmacology.* 2010;3(3):385-96.
36. Fakler B, Adelman JP. Control of  $\text{K}(\text{Ca})$  channels by calcium nano/microdomains. *Neuron.* 2008;59(6):873-81.
37. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology.* 2006;21:69-78.
38. Pluznick JL, Sansom SC. BK channels in the kidney: role in  $\text{K}^{+}$  secretion and localization of molecular components. *American journal of physiology Renal physiology.* 2006;291(3):F517-29.
39. Fettiplace R, Fuchs PA. Mechanisms of hair cell tuning. *Annual review of physiology.* 1999;61:809-34.
40. Douglas RM, Lai JC, Bian S, Cummins L, Moczydlowski E, Haddad GG. The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience.* 2006;139(4):1249-61.
41. Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *The Journal of cell biology.* 2014;206(2):151-62.
42. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *PharmacolRev.* 2005;57(4):473-508.
43. Isom LL, De Jongh KS, Catterall WA. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron.* 1994;12(6):1183-94.

44. Li Y, Um SY, McDonald TV. Voltage-gated potassium channels: regulation by accessory subunits. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2006;12(3):199-210.
45. Bernard AC, G.K.; Grissmer, S.; Gutman, G.A.; Jan, L.Y.; Lazdunski, M.; Mckinnon, D.; Pardo, L.A.; Robertson, G.A.; Rudy, B.; Sanguinetti, M.C.; Stühmer, W.; Trimmer, J.S.; Wang, X. Voltage-gated potassium channels, introduction. *IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY*. 2015.
46. Hille B. Ion channels of excitable membranes. Third edition ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press; 2001. xviii, 814 pages p.
47. Rasband MN, Trimmer JS. Subunit composition and novel localization of K<sup>+</sup> channels in spinal cord. *The Journal of comparative neurology*. 2001;429(1):166-76.
48. Rhodes KJ, Keilbaugh SA, Barrezueta NX, Lopez KL, Trimmer JS. Association and colocalization of K<sup>+</sup> channel alpha- and beta-subunit polypeptides in rat brain. *J Neurosci*. 1995;15(7 Pt 2):5360-71.
49. Matsubara H, Liman ER, Hess P, Koren G. Pretranslational mechanisms determine the type of potassium channels expressed in the rat skeletal and cardiac muscles. *J Biol Chem*. 1991;266(20):13324-8.
50. Klumpp DJ, Song EJ, Pinto LH. Identification and localization of K<sup>+</sup> channels in the mouse retina. *VisNeurosci*. 1995;12(6):1177-90.
51. Roberds SL, Tamkun MM. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(5):1798-802.
52. Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature*. 1988;332(6167):837-9.
53. Klumpp DJ, Farber DB, Bowes C, Song EJ, Pinto LH. The potassium channel MBK1 (Kv1.1) is expressed in the mouse retina. *Cell MolNeurobiol*. 1991;11(6):611-22.
54. Decoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*. 1984;307:465-8.
55. Nelson DJ, Jow B, Jow F. Whole-cell currents in macrophages: I. Human monocyte-derived macrophages. *The Journal of membrane biology*. 1990;117(1):29-44.
56. Wulff H, Knaus HG, Pennington M, Chandy KG. K<sup>+</sup> channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol*. 2004;173(2):776-86.
57. Mullen KM, Rozycka M, Rus H, Hu L, Cudrici C, Zafranskaia E, et al. Potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 are expressed on blood-derived dendritic cells in the central nervous system. *Ann Neurol*. 2006;60(1):118-27.
58. Coleman SK, Newcombe J, Pryke J, Dolly JO. Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *JNeurochem*. 1999;73(2):849-58.



59. Grunnet M, Rasmussen HB, Hay-Schmidt A, Rosenstjerne M, Klaerke DA, Olesen SP, et al. KCNE4 is an inhibitory subunit to Kv1.1 and Kv1.3 potassium channels. *Biophysical Journal*. 2003;85(3):1525-37.
60. Villalonga N, Escalada A, Vicente R, Sanchez-Tillo E, Celada A, Solsona C, et al. Kv1.3/Kv1.5 heteromeric channels compromise pharmacological responses in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(4):913-8.
61. Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, et al. Selective blockade of T lymphocyte K<sup>+</sup> channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(24):13942-7.
62. Wulff H, Beeton C, Chandy KG. Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2003;6(5):640-7.
63. Szabo I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, et al. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(39):14861-6.
64. Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM. Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K<sup>+</sup> channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J*. 1991;5(3):331-7.
65. Philipson LH, Hice RE, Schaefer K, LaMendola J, Bell GI, Nelson DJ, et al. Sequence and functional expression in *Xenopus* oocytes of a human insulinoma and islet potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(1):53-7.
66. Grupe A, Schroter KH, Ruppertsberg JP, Stocker M, Drewes T, Beckh S, et al. Cloning and expression of a human voltage-gated potassium channel. A novel member of the RCK potassium channel family. *EMBO J*. 1990;9(6):1749-56.
67. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Golovina VA, Rubin LJ. Molecular basis and function of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *The American journal of physiology*. 1998;274(4 Pt 1):L621-35.
68. Gazula VR, Strumbos JG, Mei X, Chen H, Rahner C, Kaczmarek LK. Localization of Kv1.3 channels in presynaptic terminals of brainstem auditory neurons. *The Journal of comparative neurology*. 2010;518(16):3205-20.
69. Dodson PD, Barker MC, Forsythe ID. Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *J Neurosci*. 2002;22(16):6953-61.
70. Bardien-Kruger S, Wulff H, Arieff Z, Brink P, Chandy KG, Corfield V. Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, KCNA7, a candidate gene for inherited cardiac disorders, and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *European journal of human genetics : EJHG*. 2002;10(1):36-43.
71. Finol-Urdaneta RK, Remedi MS, Raasch W, Becker S, Clark RB, Struver N, et al. Block of Kv1.7 potassium currents increases glucose-stimulated insulin secretion. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(5):424-34.
72. Drewe JA, Verma S, Frech G, Joho RH. Distinct spatial and temporal expression patterns of K<sup>+</sup> channel mRNAs from different subfamilies. *J Neurosci*. 1992;12(2):538-48.

73. Barry DM, Trimmer JS, Merlie JP, Nerbonne JM. Differential expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunits in adult rat heart. Relation to functional K<sup>+</sup> channels? *Circ Res*. 1995;77(2):361-9.
74. Jacobson DA, Kuznetsov A, Lopez JP, Kash S, Ammala CE, Philipson LH. Kv2.1 ablation alters glucose-induced islet electrical activity, enhancing insulin secretion. *Cell metabolism*. 2007;6(3):229-35.
75. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*. 1996;384(6604):78-80.
76. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 1996;384(6604):80-3.
77. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Human mutation*. 2009;30(11):1486-511.
78. Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels causes epilepsy. *Nature*. 1998;396(6712):687-90.
79. Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Ramakrishnan P, Neubauer MG, et al. Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem*. 1998;273(31):19419-23.
80. Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem*. 2000;275(31):24089-95.
81. Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*. 1999;96(3):437-46.
82. Stott JB, Jepps TA, Greenwood IA. K(V)7 potassium channels: a new therapeutic target in smooth muscle disorders. *Drug discovery today*. 2014;19(4):413-24.
83. Martinez R, Stuhmer W, Martin S, Schell J, Reichmann A, Rohde V, et al. Analysis of the expression of Kv10.1 potassium channel in patients with brain metastases and glioblastoma multiforme: impact on survival. *BMC cancer*. 2015;15:839.
84. Simons C, Rash LD, Crawford J, Ma L, Cristofori-Armstrong B, Miller D, et al. Mutations in the voltage-gated potassium channel gene KCNH1 cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nature genetics*. 2015;47(1):73-7.
85. Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, et al. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J*. 1999;18(20):5540-7.
86. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*. 1995;81(2):299-307.

87. Priest BT, Bell IM, Garcia ML. Role of hERG potassium channel assays in drug development. *Channels (Austin)*. 2008;2(2):87-93.
88. Zou A, Lin Z, Humble M, Creech CD, Wagoner PK, Krafte D, et al. Distribution and functional properties of human KCNH8 (Elk1) potassium channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(6):C1356-66.
89. Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Kohda M, Furuichi K. New ether-a-go-go K(+) channel family members localized in human telencephalon. *J Biol Chem*. 1999;274(35):25018-25.
90. Salkoff L, Wyman R. Genetic modification of potassium channels in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature*. 1981;293(5829):228-30.
91. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*. 2005;309(5736):897-903.
92. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*. 1991;350:232-5.
93. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetschner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998;280(5360):69-77.
94. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006;440(7083):463-9.
95. Armstrong C. The vision of the pore. *Science*. 1998;280(5360):56-7.
96. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*. 2003;423(6935):33-41.
97. del Camino D, Holmgren M, Liu Y, Yellen G. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel and its structural implications. *Nature*. 2000;403(6767):321-5.
98. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 1984;312(5990):121-7.
99. Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*. 2010;67(6):915-28.
100. Armstrong CM, Bezanilla F. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J Gen Physiol*. 1974;63(5):533-52.
101. Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev*. 2000;80(2):555-92.
102. Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. 2005;309(5736):903-8.
103. Gandhi CS, Clark E, Loots E, Pralle A, Isacoff EY. The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain. *Neuron*. 2003;40(3):515-25.
104. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *Journal of General Physiology*. 1994;103:279-319.

105. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *Journal of General Physiology*. 1994;103:321-62.
106. Osteen JD, Barro-Soria R, Robey S, Sampson KJ, Kass RS, Larsson HP. Allosteric gating mechanism underlies the flexible gating of KCNQ1 potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(18):7103-8.
107. Zaydman MA, Silva JR, Delaloye K, Li Y, Liang H, Larsson HP, et al. Kv7.1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(32):13180-5.
108. Lorinczi E, Gomez-Posada JC, de la Pena P, Tomczak AP, Fernandez-Trillo J, Leipscher U, et al. Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains. *Nature communications*. 2015;6:6672.
109. Whicher JR, MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K(+) channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science*. 2016;353(6300):664-9.
110. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*. 1990;250(4980):533-8.
111. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*. 1991;7:547-56.
112. Hoshi T, Armstrong CM. C-type inactivation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels: pore constriction or dilation? *J Gen Physiol*. 2013;141(2):151-60.
113. Baukrowitz T, Yellen G. Use-Dependent Blockers and Exit Rate of the Last Ion from the Multi-Ion Pore of a K<sup>+</sup> Channel *Science*. 1996;271:653-6.
114. López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors and Channels*. 1993;1:61-71.
115. Molina A, Castellano AG, Lopez-Barneo J. Pore mutations in Shaker K<sup>+</sup> channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J Physiol*. 1997;499 ( Pt 2):361-7.
116. Armstrong C, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *Journal of General Physiology*. 1977;70:567-90.
117. Bezanilla F, Perozo E, Papazian DM, Stefani E. Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science*. 1991;254(5032):679-83.
118. Fedida D, Bouchard R, Chen FS. Slow gating charge immobilization in the human potassium channel Kv1.5 and its prevention by 4-aminopyridine. *J Physiol*. 1996;494 ( Pt 2):377-87.
119. Olcese R, Latorre R, Toro L, Bezanilla F, Stefani E. Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels. *Journal of General Physiology*. 1997;110(5):579-89.
120. Deutsch C, Lee SC. Modulation of K<sup>+</sup> currents in human lymphocytes by pH. *Journal of Physiology (London)*. 1989;413:399-413.

121. Busch AE, Hurst RS, North RA, Adelman JP, Kavanaugh MP. Current inactivation involves a histidine residue in the pore of the rat lymphocyte potassium channel RGK5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;179:1384-90.
122. Perez-Cornejo P. H<sup>+</sup> ion modulation of C-type inactivation of Shaker K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch*. 1999;437(6):865-70.
123. Steidl JV, Yool AJ. Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Mol Pharmacol*. 1999;55(5):812-20.
124. Claydon TW, Boyett MR, Sivaprasadarao A, Ishii K, Owen JM, O'Beirne HA, et al. Inhibition of the K<sup>+</sup> channel kv1.4 by acidosis: protonation of an extracellular histidine slows the recovery from N-type inactivation. *J Physiol*. 2000;526 Pt 2:253-64.
125. Claydon TW, Vaid M, Rezazadeh S, Kwan DC, Kehl SJ, Fedida D. A direct demonstration of closed-state inactivation of K<sup>+</sup> channels at low pH. *JGenPhysiol*. 2007;129(5):437-55.
126. Kehl SJ, Eduljee C, Kwan DC, Zhang S, Fedida D. Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn(2+). *J Physiol*. 2002;541(Pt 1):9-24.
127. D'Arrigo JS. Axonal surface charges: binding or screening by divalent cations governed by external pH. *J Physiol*. 1974;243(3):757-64.
128. Agmon N. The Grotthuss Mechanism. *Chem Phys Lett*. 1995;244(5-6):456-62.
129. Deutsch C, Krause D, Lee SC. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *Journal of Physiology (London)*. 1986;372:405-23.
130. Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *ImmunolRev*. 2009;231(1):59-87.
131. Panyi G, Varga Z, Gaspar R. Ion channels and lymphocyte activation. *ImmunolLett*. 2004;92:55-66.
132. Hogan PG, Rao A. Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(5):235-45.
133. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell*. 1999;96(5):611-4.
134. Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR. Calcium signalling in lymphocytes. *CurrOpinImmunol*. 2003;15(3):299-307.
135. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, et al. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. *JClinInvest*. 2003;111(11):1703-13.
136. Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *ProcNatlAcadSciUSA*. 2006;103(46):17414-9.

137. Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *ProcNatlAcadSciUSA*. 2005;102(31):11094-9.
138. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, et al. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(47):37137-49.
139. Hu L, Gocke AR, Knapp E, Rosenzweig JM, Grishkan IV, Baxi EG, et al. Functional blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 mediates reversion of T effector to central memory lymphocytes through SMAD3/p21cip1 signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(2):1261-8.
140. Gocke AR, Lebson LA, Grishkan IV, Hu L, Nguyen HM, Whartenby KA, et al. Kv1.3 deletion biases T cells toward an immunoregulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2012;188(12):5877-86.
141. Tarcha EJ, Chi V, Munoz-Elias EJ, Bailey D, Londono LM, Upadhyay SK, et al. Durable pharmacological responses from the peptide ShK-186, a specific Kv1.3 channel inhibitor that suppresses T cell mediators of autoimmune disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2012;342(3):642-53.
142. Azam P, Sankaranarayanan A, Homerick D, Griffey S, Wulff H. Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(6):1419-29.
143. Bradding P, Wulff H. The K<sup>+</sup> channels K(Ca)<sub>3.1</sub> and K(v)<sub>1.3</sub> as novel targets for asthma therapy. *Br J Pharmacol*. 2009;157(8):1330-9.
144. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;46(1-3):3-26.
145. Bartok A, Panyi G, Varga Z. Potassium Channel-Blocking Peptide Toxins from Scorpion Venom. In: Gopalakrishnakone P, Ferroni Schwartz E, Possani LD, Rodríguez de la Vega RC, editors. *Scorpion Venoms: Scorpion Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. p. 493-527.
146. Quintero-Hernandez V, Jimenez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013;76:328-42.
147. Aiyar J, Rizzi JP, Gutman GA, Chandy KG. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(49):31013-6.
148. Nguyen AN, Kath JC, Hanson DC, Biggers MS, Cannif PC, Donovan CB, et al. Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *MolPharmacol*. 1996;50:1672-9.
149. Naranjo D, Miller C. A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. 1996;16(1):123-30.
150. Rauer H, Lanigan MD, Pennington MW, Aiyar J, Ghanshani S, Cahalan MD, et al. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets



- Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(2):1201-8.
151. Goldstein SA, Pheasant DJ, Miller C. The Charybdotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron*. 1994;12:1377-88.
152. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):557-94.
153. Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers*. 1998;47(6):465-77.
154. Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*. 2002;216(2):193-202.
155. Caldwell JE, Abildgaard F, Dzakula Z, Ming D, Hellekant G, Markley JL. Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nature structural biology*. 1998;5(6):427-31.
156. Miller C. Competition for block of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel by charybdotoxin and tetraethylammonium. *Neuron*. 1988;1(10):1003-6.
157. Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, et al. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J Biol Chem*. 1997;272(7):4302-9.
158. Rodriguez de la Vega RC, Merino E, Becerril B, Possani LD. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *Trends PharmacolSci*. 2003;24(5):222-7.
159. Cui M, Shen J, Briggs JM, Fu W, Wu J, Zhang Y, et al. Brownian dynamics simulations of the recognition of the scorpion toxin P05 with the small-conductance calcium-activated potassium channels. *Journal of molecular biology*. 2002;318(2):417-28.
160. Tseng GN, Sonawane KD, Korolkova YV, Zhang M, Liu J, Grishin EV, et al. Probing the outer mouth structure of the HERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling. *Biophys J*. 2007;92(10):3524-40.
161. Pardo-Lopez L, Zhang M, Liu J, Jiang M, Possani LD, Tseng GN. Mapping the Binding Site of a Human ether-a-go-go-related Gene-specific Peptide Toxin (ErgTx) to the Channel's Outer Vestibule. *J Biol Chem*. 2002;277(19):16403-11.
162. Brown AM. Drugs, hERG and sudden death. *Cell Calcium*. 2004;35(6):543-7.
163. van Noord C, Sturkenboom MC, Straus SM, Wittman JC, Stricker BH. Non-cardiovascular drugs that inhibit hERG-encoded potassium channels and risk of sudden cardiac death. *Heart*. 2011;97(3):215-20.
164. Guo J, Zeng W, Chen Q, Lee C, Chen L, Yang Y, et al. Structure of the voltage-gated two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2016;531(7593):196-201.
165. Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E. Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *FEBS Lett*. 1999;445(2-3):231-6.

166. Lu B, Su Y, Das S, Liu J, Xia J, Ren D. The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell*. 2007;129(2):371-83.
167. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. 2016;579(2):95-132.
168. Alexander SP, Peters JA, Kelly E, Marrion N, Benson HE, Faccenda E, et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol*. 2015;172(24):5870-903.
169. Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature*. 2009;460(7255):599-604.
170. Grunder S, Chen X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2010;2(2):73-94.
171. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, et al. Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci*. 2002;5(6):511-2.
172. Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, et al. Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na<sup>+</sup>] sensing. *Neuron*. 2007;54(1):59-72.
173. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews*. 2005;57(4):397-409.
174. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;28(2):365-8.
175. Narahashi T, Moore JW, Scott WR. Tetrodotoxin Blockage of Sodium Conductance Increase in Lobster Giant Axons. *J Gen Physiol*. 1964;47:965-74.
176. Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*. 2014;6(2):693-755.
177. Gilchrist J, Olivera BM, Bosmans F. Animal toxins influence voltage-gated sodium channel function. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;221:203-29.
178. Ahern CA, Payandeh J, Bosmans F, Chanda B. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J Gen Physiol*. 2016;147(1):1-24.
179. Catterall WA. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. *Novartis Foundation symposium*. 2002;241:206-18; discussion 18-32.
180. Beneski DA, Catterall WA. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(1):639-43.
181. Fozzard HA, Sheets MF, Hanck DA. The sodium channel as a target for local anesthetic drugs. *Frontiers in pharmacology*. 2011;2:68.

182. Goldschen-Ohm MP, Capes DL, Oelstrom KM, Chanda B. Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel. *Nature communications*. 2013;4:1350.
183. Cha A, Ruben PC, George AL, Jr., Fujimoto E, Bezanilla F. Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na<sup>+</sup> channel fast inactivation. *Neuron*. 1999;22(1):73-87.
184. Sheets MF, Hanck DA. Charge immobilization of the voltage sensor in domain IV is independent of sodium current inactivation. *J Physiol*. 2005;563(Pt 1):83-93.
185. Rogart RB, Cribbs LL, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW. Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na<sup>+</sup> channel isoform. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1989;86(20):8170-4.
186. Satin J, Kyle JW, Chen M, Bell P, Cribbs LL, Fozzard HA, et al. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*. 1992;256(5060):1202-5.
187. Silva JN, Silva JR. Updates on the inherited cardiac ion channelopathies: from cell to clinical. *Current treatment options in cardiovascular medicine*. 2012;14(5):473-89.
188. Zaydman MA, Silva JR, Cui J. Ion channel associated diseases: overview of molecular mechanisms. *Chemical reviews*. 2012;112(12):6319-33.
189. Sheets MF, Fozzard HA, Lipkind GM, Hanck DA. Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity. *Trends in cardiovascular medicine*. 2010;20(1):16-21.
190. Mannuzzu LM, Moronne MM, Isacoff EY. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*. 1996;271(5246):213-6.
191. Beeton C, Chandy KG. Induction and monitoring of active delayed type hypersensitivity (DTH) in rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2007(6):237.
192. Guan B, Chen X, Zhang H. Two-electrode voltage clamp. *Methods in molecular biology*. 2013;998:79-89.
193. Stefani E, Bezanilla F. Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Methods in enzymology*. 1998;293:300-18.
194. Rudokas MW, Varga Z, Schubert AR, Asaro AB, Silva JR. The *Xenopus* oocyte cut-open vaseline gap voltage-clamp technique with fluorometry. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(85).
195. Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*. 1973;242(5398):459-61.
196. Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. 1996;16(6):1159-67.
197. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391:85-100.

198. Varga Z, Rayner MD, Starkus JG. Cations affect the rate of gating charge recovery in wild-type and W434F Shaker channels through a variety of mechanisms. *J Gen Physiol* JID - 2985110R. 2002;119(5):467-85.
199. Starkus JG, Kuschel L, Rayner MD, Heinemann SH. Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *Journal of General Physiology*. 1997;110(5):539-50.
200. Panyi G, Deutsch C. Crosstalk Between Activation and Slow Inactivation Gates of Shaker Potassium Channels. *JGenPhysiol*. 2006;128:547-59.
201. Starkus JG, Varga Z, Schonherr R, Heinemann SH. Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons. *Pflugers Arch*. 2003;447(1):44-54.
202. Baukrowitz T, Yellen G. Modulation of K<sup>+</sup> current by frequency and external [K<sup>+</sup>]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*. 1995;15:951-60.
203. Somodi S, Varga Z, Hajdu P, Starkus JG, Levy DI, Gaspar R, et al. pH dependent modulation of Kv1.3 inactivation: the role of His399. *AmJ Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C1067-C76.
204. Grissmer S, Cahalan MD. Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *Journal of General Physiology*. 1989;93:609-30.
205. Peter M, Jr., Varga Z, Hajdu P, Gaspar R, Jr., Damjanovich S, Horjales E, et al. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J MembrBiol*. 2001;179(1):13-25.
206. Olamendi-Portugal T, Somodi S, Fernandez JA, Zamudio FZ, Becerril B, Varga Z, et al. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K<sup>+</sup> channels of T cells. *Toxicon*. 2005;46(4):418-29.
207. Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodriguez de la Vega RC, et al. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *BiochemPharmacol*. 2008;76:1142-54.
208. Papp F, Batista CV, Varga Z, Herceg M, Roman-Gonzalez SA, Gaspar R, et al. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon*. 2009;54(4):379-89.
209. Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, et al. Anurotoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *MolPharmacol*. 2005;67(4):1034-44.
210. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, et al. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol Pharmacol*. 2012;82(3):372-82.
211. Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ. Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon*. 2004;43(8):877-86.

212. Escobar L, Root MJ, MacKinnon R. Influence of protein surface charge on the bimolecular kinetics of a potassium channel peptide inhibitor. *Biochemistry*. 1993;32(27):6982-7.
213. Mullmann TJ, Munujos P, Garcia ML, Giangiacomo KM. Electrostatic mutations in Iberitoxin as a unique tool for probing the electrostatic structure of the Maxi-K channel outer vestibule. *Biochemistry*. 1999;38:2395-402.
214. Zachariae U, Schneider R, Velisetty P, Lange A, Seeliger D, Wacker SJ, et al. The molecular mechanism of toxin-induced conformational changes in a potassium channel: relation to C-type inactivation. *Structure*. 2008;16(5):747-54.
215. Bednarek MA, Bugianesi RM, Leonard RJ, Felix JP. Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(2):619-25.
216. Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Knaus HG. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(5):2639-44.
217. Mouhat S, Mosbah A, Visan V, Wulff H, Delepierre M, Darbon H, et al. The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *BiochemJ*. 2004;377(Pt 1):25-36.
218. Visan V, Fajloun Z, Sabatier JM, Grissmer S. Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1.2, hKv1.3, and hKCa1 channels. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1103-12.
219. Crest M, Jacquet G, Gola M, Zerrouk H, Benslimane A, Rochat H, et al. Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem*. 1992;267(3):1640-7.
220. Mouhat S, Visan V, Ananthakrishnan S, Wulff H, Andreotti N, Grissmer S, et al. K<sup>+</sup> channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochemical Journal*. 2005;385:95-104.
221. Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, et al. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *BiochemJ*. 1997;328 ( Pt 1):321-7.
222. Kharrat R, Mabrouk K, Crest M, Darbon H, Oughideni R, Martin-Eauclaire MF, et al. Chemical synthesis and characterization of maurotoxin, a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K<sup>+</sup> channels. *EurJBiochem*. 1996;242(3):491-8.
223. Peter M, Hajdu P, Varga Z, Damjanovich S, Possani LD, Panyi G, et al. Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;278(1):34-7.
224. Jouirou B, Mosbah A, Visan V, Grissmer S, M'Barek S, Fajloun Z, et al. Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K<sup>+</sup> channels. *The Biochemical journal*. 2004;377(Pt 1):37-49.

225. M'Barek S, Mosbah A, Sandoz G, Fajloun Z, Olamendi-Portugal T, Rochat H, et al. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem*. 2003;270(17):3583-92.
226. Regaya I, Beeton C, Ferrat G, Andreotti N, Darbon H, De Waard M, et al. Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTx1 scorpion toxins. *J Biol Chem*. 2004;in press.
227. Kupper J, Prinz AA, Fromherz P. Recombinant Kv1.3 potassium channels stabilize tonic firing of cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch*. 2002;443(4):541-7.
228. Jang SH, Choi SY, Ryu PD, Lee SY. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *European journal of pharmacology*. 2011;651(1-3):26-32.
229. Bartok A, Toth A, Somodi S, Szanto TG, Hajdu P, Panyi G, et al. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*. 2014;87:6-16.
230. Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood*. 2003;101(5):1677-82.
231. Varga Z, Zhu W, Schubert AR, Pardieck JL, Krumholz A, Hsu EJ, et al. Direct Measurement of Cardiac Na<sup>+</sup> Channel Conformations Reveals Molecular Pathologies of Inherited Mutations. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*. 2015.
232. Chanda B, Bezanilla F. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *J Gen Physiol*. 2002;120(5):629-45.
233. Hartmann HA, Tiedeman AA, Chen SF, Brown AM, Kirsch GE. Effects of III-IV linker mutations on human heart Na<sup>+</sup> channel inactivation gating. *Circulation Research*. 1994;75(1):114-22.
234. Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, et al. Multiple mechanisms of Na<sup>+</sup> channel--linked long-QT syndrome. *Circ Res*. 1996;78(5):916-24.
235. Tian XL, Yong SL, Wan X, Wu L, Chung MK, Tchou PJ, et al. Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovascular research*. 2004;61(2):256-67.
236. McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*. 1998;273(2):1121-9.
237. Mines GR. On dynamic equilibrium in the heart. *J Physiol*. 1913;46(4-5):349-83.



## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönem fejezem ki a néhai Dr. Gáspár Rezső professzor úrnak, aki az egyetem Biofizikai Intézetébe, és azon belül munkacsoportjába invitált, és bevezetett az elektrofiziológiai kutatásokba. Hálával tartozom a néhai Dr. Damjanovich Sándor és Dr. Szöllösi János akadémikusoknak, hogy az Intézet vezetőjeként biztosították kutatómunkám háttérét és támogatták tudományos karrierem előre haladását.

Legnagyobb köszönettel Dr. Panyi György professzor úrnak, munkacsoportunk vezetőjének tartozom, akitől sok építő jellegű kritikát, ösztökélést és tanácsot kaptam az évek során, s ezért rengeteget tanultam. Nem csak szakmailag, hanem emberileg, barátilag is felbecsülhetetlen értékű támogatást kaptam tőle, így e munka létrejöttében meghatározó szerepe volt. Neki köszönhető, hogy munkacsoportunkban mindig kiváló munkatársakkal dolgozhattam együtt, széleskörű kapcsolatrendszere révén könnyen építhettünk ki kollaborációkat, és végezhattük kutatómunkánkat neves külföldi laboratóriumokban. A labor folyamatos fejlesztése révén mindig biztosította számunkra a kutatáshoz szükséges anyagi, személyi és technikai háttérrel. Ezen felül jelenléte kitűnő hangulatú atmoszférát teremt a munkacsoportban, ami örömmé teszi a munkát a laborban.

Köszönettel tartozom a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, aki segítette munkámat. Külön köszönöm a közös munkát közvetlen munkatársaimnak az elektrofiziológiai munkacsoportban, a doktorandusz hallgatóknak és diákkörösöknek, akikkel sikerre vittük kutatási témáinkat. Közülük is kiemelném Péter Mózes, Hajdu Péter, Papp Ferenc, Szántó G. Tibor, Bartók Ádám és Somodi Sándor jelenlegi és volt kollégáimat, akik aktívan részt vettek az itt bemutatott eredmények elérésében. Köszönetet érdemel laboratóriumi asszisztenseink fáradhatatlan, lelkiismeretes munkája.

Hálás vagyok hazai és külföldi kollaborátorainknak, elsősorban Lourival Possaninak, John Starkusnak, és Jon Silvának, akikkel az eredmények egy részét közösen értük el, és akik ötletekkel, tanácsokkal segítették munkámat, valamint Leigh Plantnek, aki felnyitotta a szemem az etikus kutatással kapcsolatban.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleim példamutatását, feleségem és fiaim szerető támogatását, mely nélkül e munka nem jöhetett volna létre.

## 10. KÖZLEMÉNYEK

### 10.1 A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények:

Első vagy utolsó szerzős:

1. Varga Z, Bene L, Pieri C, Damjanovich S, Gaspar R J r

The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K<sup>+</sup> currents of human lymphocytes.

**BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 218: pp. 828-832. (1996)

IF: 2,872

társszerzős:

2. Peter M, Hajdu P, Varga Z, Damjanovich S, Possani LD, Panyi G, Gaspar R

Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin.

**BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 278: pp. 34-37. (2000)

IF: 3,055

3. Berecki G, Varga Z, van Iren F, van Duijn B

Anion channels in chara corallina tonoplast membrane: calcium dependence and rectification.

**JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY** 172: pp. 159-168. (1999)

IF: 3,187

4. Peter M, Varga Z, Panyi G, Bene L, Damjanovich S, Pieri C, Possani LD, Gaspar R

Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human lymphocytes.

**BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 242: pp. 621-625. (1998)

IF: 2,780

5. Gaspar R J r, Varga Z, Bene L, Marcheselli F, Pieri C, Damjanovich S  
Effect of acetylcholine on the electrophysiology and proliferative response of human lymphocytes.

**BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS** 226: pp. 303-308. (1996)

IF: 2,872

A PhD értekezés előtti közlemények összesített impakt faktora: 14,766

## 10.2 A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Első vagy utolsó szerzős

1. Bartok A, Feher K, Bodor A, Rakosi K, Toth GK, Kover KE, Panyi G, Varga Z  
An engineered scorpion toxin analogue with improved Kv1.3 selectivity displays reduced conformational flexibility.

**SCIENTIFIC REPORTS** 5: p. 18397. (2015)

IF: 5,228

2. Varga Z, Zhu W, Schubert AR, Pardieck JL, Krumholz A, Hsu EJ, Zaydman MA, Cui J, Silva JR

Direct Measurement of Cardiac Na<sup>+</sup> Channel Conformations Reveals Molecular Pathologies of Inherited Mutations.

**CIRCULATION: ARRHYTHMIA AND ELECTROPHYSIOLOGY** 8:(5) pp. 1228-1239. (2015).

IF: 4,428

3. Bartok A, Toth A, Somodi S, Szanto TG, Hajdu P, Panyi G, Varga Z  
Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K<sup>+</sup> channels.

**TOXICON** 87:6-16.

IF: 2,492

4. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, de la Vega RCR, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, Gaspar R, Cardenas L, Rosenstein Y, Beeton C, Possani LD, Panyi G

Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells.

**MOLECULAR PHARMACOLOGY** 82:(3) pp. 372-382. (2012)

IF: 4,411

5. Varga Z, Hajdu P, Panyi G

Ion channels in T lymphocytes: an update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases.

**IMMUNOLOGY LETTERS** 130:(1-2) pp. 19-25. (2010)

IF: 2,511

6. Somodi S, Hajdu P, Gaspar R, Panyi G, Varga Z

Effects of changes in extracellular pH and potassium concentration on Kv1.3 inactivation.

**EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL** 37:(7) pp. 1145-1156. (2008)

IF: 2,409

7. Varga Z, Hajdu P, Panyi G, Gaspar R, Krasznai Z

Involvement of membrane channels in autoimmune disorders.

**CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN** 13:(24) pp. 2456-2468. (2007)

IF: 4,868

8. Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC, Gaspar R, Varga Z

K<sup>+</sup> channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression.

**CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN** 12:(18) pp. 2199-2220. Paper 16787250. (2006)

IF: 5,270

9. Varga Z, Rayner M D, Starkus J G

Cations affect the rate of gating charge recovery in wild-type and W434F Shaker channels through a variety of mechanisms.

**JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY** 119: pp. 467-485. (2002)

IF: 5,193

társszerzős:

10. Hsu EJ, Zhu W, Schubert AR, Voelker T, Varga Z, Silva JR

Regulation of Na<sup>+</sup> Channel Inactivation by the DIII and DIV Voltage-Sensing Domains

**JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY** 149(3):389-403, (2017)

IF: 4,200

11. Rudokas MW, Varga Z, Schubert AR, Asaro AB, Silva JR

The Xenopus Oocyte Cut-open Vaseline Gap Voltage-clamp Technique With Fluorometry.

**JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS** N/A:(85) pp. N/A-N/A. doi: 10.3791/51040. (2014)

IF: 1,325

12. Gurrola GB, Hernandez-Lopez RA, de la Vega RCR, Varga Z, Batista CVF, Salas-Castillo SP, Panyi G, del Rio-Portilla F, Possani LD

Structure, Function, and Chemical Synthesis of Vaejovis mexicanus Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes.

**BIOCHEMISTRY** 51:(19) pp. 4049-4061. p. 13 (2012)

IF: 3,377

13. Papp F, Batista C F, Varga Z, Herceg M, Román-González S A, Gaspar R, Possani L D, Panyi G

Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of Tityus stigmurus.

**TOXICON** 54: pp. 379-389. (2009)

IF: 2,128

14. Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodriguez de la Vega RC, Gáspár R, Panyi G, Possani LD

A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*.

**BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY** 76:(9) pp. 1142-1154. (2008)

IF: 4,838

15. Olamendi Portugal T, Somodi S, Fernandez J A, Zamudio F Z, Becerril B, Varga Z, Panyi G, Gaspar R, Possani L D

Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K<sup>+</sup> channels of T cells.

**TOXICON** 46: pp. 418-429. (2005)

IF: 2,255

16. Bagdany M, Batista C V, Valdez Cruz N A, Somodi S, Rodriguez de la Vega R C, Licea A F, Varga Z, Gaspar R, Possani L D, Panyi G

Anurotoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes.

**MOLECULAR PHARMACOLOGY** 67: pp. 1034-1044. (2005)

IF: 4,612

17. Panyi G, Varga Z, Gaspar R

Ion channels and lymphocyte activation.

**IMMUNOLOGY LETTERS** 92: pp. 55-66. (2004)

IF: 2,136

18. Starkus J G, Varga Z, Schonherr R, Heinemann S H

Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons.



**PFLÜGERS ARCHIV FÜR DIE GESAMTE PHYSIOLOGIE DES MENSCHEN UND DER TIERE** 447: pp. 44-54. (2003)

IF: 2,063

A tézisek alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 63,744

### 10.3 A PhD értekezést követő egyéb közlemények:

1. Balajthy A, Hajdu P, Panyi G, Varga Z.

Sterol Regulation of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels.

**CURRENT TOPICS IN MEMBRANES** 80:255-292. (2017)

IF: 2,976

2. Zhu W, Voelker TL, Varga Z, Schubert AR, Nerbonne JM, Silva JR.

Mechanisms of noncovalent  $\beta$  subunit regulation of Na<sub>v</sub> channel gating.

**JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY**, 2017 Jul 18. pii: jgp.201711802. doi: 10.1085/jgp.201711802. [Epub ahead of print]

IF: 4,200

3. Pajtás D, Kónya K, Kiss-Szikszai A, Džubák P, Pethő Z, Varga Z, Panyi G, Patonay T.

Optimization of the Synthesis of Flavone-Amino Acid and Flavone-Dipeptide Hybrids via Buchwald-Hartwig Reaction.

**JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY** 82(9):4578-4587, (2017)

IF: 4,849

4. Petho Z, Balajthy A, Bartok A, Bene K, Somodi S, Szilagyi O, Rajnavolgyi E, Panyi G, Varga Z

The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation.

**IMMUNOLOGY LETTERS** 171: pp. 60-69. (2016)

IF: 2,483

5. Balajthy A, Somodi S, Pethő Z, Péter M, Varga Z, Szabó GP, Paragh G, Vigh L, Panyi G, Hajdu P

7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome.

**PFLUGERS ARCHIV** 468(8):1403-18, (2016)

IF: 3,654

6. Feher K, Timari I, Rakosi K, Szolomajer J, Illyes T, Bartok A, Varga Z, Panyi G, Toth G, Kover K

Probing pattern and dynamics of disulfide bridges using synthesis and NMR of an ion channel blocker peptide toxin with multiple diselenide bonds.

**CHEMICAL SCIENCE** 7:(4) pp. 2666-2673. (2016)

IF: 9,144

7. Zhu W, Varga Z, Silva J R

Molecular motions that shape the cardiac action potential: Insights from voltage clamp fluorometry

**PROGRESS IN BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY** 120:(1-3) pp. 3-17. (2016)

IF: 2,581

8. Varga Z, Juhasz T, Matta C, Fodor J, Katona E, Bartok A, Olah T, Sebe A, Csernoch L, Panyi G, Zakany R

Switch of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Expression in the Plasma Membrane of Chondrogenic Cells Affects Cytosolic Ca<sup>2+</sup>-Oscillations and Cartilage Formation.

**PLOS ONE** 6:(11) pp. 1-14. Paper e27957. (2011)

IF: 4,092

9. Varga Z, Csepany T, Papp F, Fabian A, Gogolak P, Toth A, Panyi G

Potassium channel expression in human CD4<sup>+</sup> regulatory and naive T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients.

**IMMUNOLOGY LETTERS** 124: pp. 95-101. (2009)

IF: 2,906

10. Vamosi G, Bodnar A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, Damjanovich L

The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes.

**IMMUNOLOGY LETTERS** 104: pp. 53-58. (2006)

IF: 2,352

11. Detre C, Kiss E, Varga Z, Ludanyi K, Paszty K, Enyedi A, Kovesdi D, Panyi G, Rajnavolgyi E, Matko J

Death or survival: Membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration.

**CELLULAR SIGNALLING** 18:(3) pp. 294-306. (2006)

IF: 4,887

12. Somodi S, Varga Z, Hajdu P, Starkus JG, Levy DI, Gaspar R, Panyi G

pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation: role of His399.

**AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY** 287: pp. C1067-C1076. (2004)

IF: 3,939

13. Panyi G, Vamosi G, Bacso Z, Bagdany M, Bodnar A, Varga Z, Gaspar R, Matyus L, Damjanovich S

Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells.

**PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA** 101: pp. 1285-1290. (2004)

IF: 10,452

14. Hajdu P, Varga Z, Pieri C, Panyi G, Gaspar R

Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes.

**PFLÜGERS ARCHIV - EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY** 445: pp. 674-682.  
(2003)

IF: 2,063

15. Varga Z, Panyi G, Peter M J r, Pieri C, Csecsei G, Damjanovich S, Gaspar R J r

Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3.

**BIOPHYSICAL JOURNAL** 80: pp. 1280-1297. (2001)

IF: 4,636

16. Peter M, Varga Z, Hajdu P, Gaspar R, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G

Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: The role of Glu7 and Lys24.

**JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY** 179: pp. 13-25. (2001)

IF: 2,787

A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények összesített impakt faktora: 68,001

## 10.4 Könyvfejezetek

1. Bartok A., Panyi G., Varga Z. Potassium Channel-Blocking Peptide Toxins from Scorpion Venom. In: Toxinology, DOI 10.1007/978-94-007-6647-1\_30-1, Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

2. Varga Z. és Gaspar R.Jr. Signal transduction by ion channels in lymphocytes. In: Biophysical aspects of transmembrane signaling. Damjanovich, S. (ed.), Springer Verlag, Berlin, (2005) pp. 293-315.

3. Panyi Gy., Somodi S., Varga Z., Hajdú P., Pieri C., Pandi-Perumal S.R., Damjanovich S., Gáspár R. Pharmacological effects of melatonin on ion channels. In: Treatise on Pineal Gland and Melatonin, Ed.: Chandana Haldar et al., Oxford & IBH Publishing Co. (2002) pp. 489-506
4. Péter M., Varga Z., Krasznai Z., Panyi G., Gáspár R. Jr. Recording and analysis of membrane potential and ion currents in cultured peripheral human lymphocytes. In: Practical guide to physical analysis of cell surface receptors, Eds Krasznai Z., Mátyus L., Department of Biophysics and Cell Biology, University Medical School of Debrecen, Debrecen (1998) pp.1-16.
5. Gaspar R. Jr., Varga Z., Panyi Gy., Krasznai Z., Pieri C., Damjanovich S. Measurement and analysis of different aspects of potassium currents in human lymphocytes. In: Signal Transduction. Single cell techniques Eds. Bert van Duijn and Anneke Wiltink, Springer Verlag, (1997) pp. 214-235.

### **10.5 Tudománymetriai összesítés:**

**Az összes közlemény impakt faktora: 146,511      Független hivatkozás: 605**